STAMMVERBESSERUNG UND FERMENTATION VON BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Harald Weisser
aus Rottweil

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0083

STAMMVERBESSERUNG UND FERMENTATION VON BACILLUS THURINGIENSIS VAR. ISRAELENSIS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Harald Weisser
aus Rottweil

1986

Tag der mündlichen Prüfung : 04. Juli 1986

Dekan : Prof. Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Wolf

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner und der Anleitung von Herrn Dr. K. Bernhard am Lehrstuhl Mikrobiologie I, Institut für Biologie II, der Universität Tübingen angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die großzügige Unterstützung, danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Herrn Dr. K. Bernhard danke ich für die gute Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Anregungen.

Bei Herrn Dr. H. Schwarz, vom MPI für Biologie, möchte ich mich für die vielen elektronenmikroskopischen Aufnahmen bedanken.

Herrn Chem.-Ing. G. Grewe danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen im Bereich der Fermentation.

Für die Herstellung der Zeichnungen danke ich Frau Dr. E. Fiedler und Herrn Wusch.

Den Kollegen des B.t.-Arbeitskreises: Christine Wondrak, Sabine Meyborg, Marion Mahnke und Dietmar Schall, sowie allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	12
1.	Chemikalien	12
1.1.	Chemikalien für Nährmedien	12
1.2.	Chemikalie für Mutagenese	13
1.3.	Chemikalien für Fermentationsanalytik	13
1.4.	Chemikalien für Kristallisolierung und Elektrophorese	13
2.	Nährmedien	14
3.	Puffer und Lösungen	15
3.1.	Spurenelementelösung für B.t.	15
3.2.	SSC - Puffer	15
3.3.	Lösungen zur Ammoniumbestimmung	15
3.4.	Puffer zur Kristallisolierung	15
3.5.	Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese	15
3.6.	Fixierlösung für Elektronenmikroskopie	16
4.	Organismus	17
4.1.	Kulturbedingungen	17
4.1.1.	Wildtyp 60A	17
4.1.2.	Sporendefekte Mutanten	17
4.1.3.	Einfrieren bei $-80^{o}C$	17
4.1.4.	Lyophilisieren	18
4.2.	Schüttelkolbenversuche	18
4.3.	Fermentation	18
4.3.1.	10-l-Fermentation	19
4.3.2.	25-l-Fermentation	19

4.3.3.	200-l-Fermentation	19
4.4.	Ernte der Kristalle	19
5.	Messen und Regeln einiger Fermentations-parameter	20
5.1.	Messung und Regelung der Temperatur	20
5.2.	Messung und Regelung des pH-Wertes	20
5.3.	Messung des pO_2	21
5.4.	Bestimmung des Luftvolumens	21
6.	Untersuchung der Fermentationsproben	21
6.1.	Bestimmung der Gesamtzellzahl	21
6.2.	Lebendkeimzahlbestimmung	21
6.3.	Bestimmung der optischen Dichte	22
6.4.	Naßgewichtsbestimmung	22
6.5.	Glucosebestimmung	22
6.6.	Stärkebestimmung	22
6.7.	Phosphatbestimmung	23
7.	Testorganismus und Biotest	23
7.1.	Testorganismus	23
7.2.	Aufzucht der Larven	24
7.3.	Aufzucht adulter Tiere	24
7.4.	Biotest	24
8.	Mutagenese	25
9.	Isolierung von Mutanten	26
9.1.	Isolierung sporendefekter Mutanten	26
9.2.	Isolierung temperatursensitiver Mutanten	26
10.	Elektronenmikroskopie	27
10.1.	Vorbereitung der Proben	27
10.2.	Herstellung und Mikroskopie der Präparate	27
11.	Isolierung der Delta-Endotoxin-Kristalle	27
11.1.	Zweiphasensystem	27

11.2. Differentielle Dichtegradienten-zentrifugation 28
11.3. Dichtegradientenzentrifugation im linearen Gradienten 29

12. Gel-Elektrophorese 29
12.1. Auflösung der Kristalle 29
12.2. Elektrophoresebedingungen 29

III. ERGEBNISSE 31

A. Stammentwicklung 31

1. Mutagenese 31

2. Isolierung kristallbildender sporen-defekter Mutanten 31
2.1. Selektion 31
2.2. Vergleich der Stämme HA5 und 60A auf zellulärer Ebene 34
2.3. Vergleich der Ultrastruktur sporulierter Zellen von HA5 und 60A 35

3. Isolierung temperatursensitiver sporen-defekter Mutanten 37
3.1. Selektion 37
3.2. Untersuchung der Kristallbildung von HA9 bei 43°C 39

B. Charakterisierung der sporendefekten Mutanten HA5 und HA9 40

1. Wachstum auf Minimalmedien 40

2. Sporulation und Kristallbildung bei HA9 41

2.1.	Beobachtungen zum Sporulationsablauf und zur Kristallbildung im Phasenkontrast-mikroskop	41
2.2.	Beobachtungen zum Sporulationsablauf und zur Kristallbildung im Elektronenmikroskop	43
3.	Entwicklung und Aufbau der parasporalen Kristalle	47
4.	Vergleich der sporendefekten Mutanten mit dem Wildtyp 60A im Biotest	52
5.	Stammpflege	55
C.	Fermentation	56
1.	Entwicklung eines Komplexmediums zur B.t.i. - Fermentation	57
1.1.	Veränderung von HGP-Medium	57
1.2.	Einfluß von Hefeautolysat- und Sojamehl-konzentration	57
1.3.	Variation der Stärkekonzentration	59
1.4.	Ersatz von Sojamehl durch andere N-Quellen	60
1.5.	Ersatz von Hefeautolysat durch Backhefe	61
1.6.	Erste Fermentation im komplexen Medium (SHS-Medium) im 10-l-Blattrührfermenter	62
2.	Variation von Fermentationsparametern	62
2.1.	Belüftung und Sauerstoffeintrag	62
2.2.	pH-Verlauf	64
2.3.	Alter der Vorkultur und Animpfdichte	67
3.	Fermentation von HA9	68
3.1.	Fermentation im Labormaßstab	68
3.2.	Fermentation im 200-l-Maßstab	72
3.3.	Recycling - Fermentation	74

4. Vergleich einiger Fermentationen im Biotest 76

5. Stabilitätstests 77

IV. DISKUSSION 79

1. Stammverbesserung: Sporendefekte, kristallbildende Mutanten von B.t.i. 79

2. Fermentation der sporendefekten Mutanten 85

V. ZUSAMMENFASSUNG 93

VI. LITERATUR 95

Im Text wurden folgende Abkürzungen verwendet:

Abb.	Abbildung
B.t.	Bacillus thuringiensis
B.t.i.	Bacillus thuringiensis var. israelensis
cry	Kristall
d	days
DNA	Desoxyribonukleinsäure
h	hours
KD	Kilo-Dalton
L	Larvalstadium
LD	lethale Dosis
M	Mol
MD	Mega-Dalton
min	minute
NG	Naßgewicht
nm	Nanometer
NTG	1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin
OD	optische Dichte
pHB	poly-beta-hydroxy-buttersäure
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
ppb	parts per billion
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
spo	Spore
t	time
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethlyethylendiamid
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
vvm	Volumen Luft/Volumen Nährlösung/Minute

I. EINLEITUNG

Die meisten Vektoren von Infektionskrankheiten sind Insekten. Hierunter nehmen Stechmücken (Ordnung Diptera) eine wichtige Position ein. Epidemiologisch weltweit bedeutend sind zum Beispiel die Gattungen Aedes, Anopheles, Culex und Simulium. Aedes ägypti überträgt in tropischen Regionen Gelbfieber, Anopheles-Arten übertragen Malaria, Simulium-Spezies verbreiten Onchocercose, die Flußblindheit, eine Krankheit, die in Äquatorialafrika weit verbreitet ist, und Culex-Arten übertragen in Südostasien Enzephalitis. In Mitteleuropa spielen diese Arten als Krankheitsvektoren keine Rolle, doch können sie in grosser Anzahl zu unangenehmen Lästlingen des Menschen und seiner Nutztiere werden. Aedes- und Culex-Arten treten z.B. in der Oberrheinischen Tiefebene immer wieder in Massen auf.

Um solche Krankheitsvektoren oder Lästlinge zu bekämpfen, stehen heutzutage mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. Entscheidend für die Methode der Wahl bleiben neben guter Wirkung auf die Schadorganismen eine Anzahl zu berücksichtigender Nebenwirkungen. Wichtig sind vor allem geringe Toxizitäten für Mensch und Tier, sowie eine geringe Belastung des gesamten Ökosystems. Der nachfolgende Überblick zeigt mit welchen Methoden die oben genannten Stechmückenarten momentan bekämpft werden können.

1. Physikalische Maßnahmen

In diese Kategorie gehört zum Beispiel das Ausbringen von Lipidfilmen auf die Wasseroberfläche, zur Vernichtung der Stechmückenlarven. Diese Methode wurde in den Rheinarmen der Oberrheinischen Tiefebene bereits angewandt (IGLISCH,1980). Die hier lebenden Aedes- und Culexlarven müssen zum Atmen an die Gewässeroberfläche; dabei verhindert der Lipidfilm die Sauerstoffaufnahme.

2. Chemische Schädlingsbekämpfung

Sie stellt mittlerweile die "klassische Methode" dar. Zum Einsatz stehen eine grosse Anzahl von chemischen Substanzen. Weltweit bekannt geworden sind Mittel wie DDT. Doch zeichnen sich immer deutlicher auch Nachteile dieser Stoffe ab, nicht zuletzt beim Einsatz in Ländern der sogenannten Dritten Welt (BOUGUERRA, 1986): unspezifische Wirkung und dadurch Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier, Schädigung von Pflanzen und in zunehmendem Maße Resistenzerscheinungen unter den zu bekämpfenden Insekten.

3. Selbstvernichtungsverfahren

Dieses Verfahren beschränkt sich vor allem auf die Sterilisierung der Schadtiere mit Chemikalien oder durch energiereiche Strahlung. Die infertilen Tiere werden wieder freigelassen und können keine Nachkommen mehr zeugen.

4. Biologische Schädlingsbekämpfung

"Unter biologischer Schädlingsbekämpfung verstehen wir die Verwendung von Lebewesen, um mit ihnen (durch menschlichen Eingriff) die Populationen bestimmter schädlicher Tiere oder Pflanzen zu begrenzen" (FRANZ und KRIEG, 1982). Die biologische Schädlingsbekämpfung gewinnt in letzter Zeit, auch mitbedingt durch ein verstärkt ökologisch orientiertes Denken in der Bevölkerung, zunehmend an Bedeutung. Dadurch steigt auch die Anzahl und Menge kommerziell eingesetzter Mittel bzw. Organismen (DEMAIN, 1983; MILLER et al., 1983; ASM NEWS, 1985).

Zur Bekämpfung von Dipteren bieten sich hinsichtlich der Wahl des Entomophagen theoretisch mehrere Möglichkeiten an (Details s. FRANZ und KRIEG, 1982):

1) Fische: In milden Klimaten werden gegen Anopheles- und Aedes-larven Cyprinidonten eingesetzt.
2) Mückenpathogene Pilze: Gegen Culiciden kann z.B. der Pilz Culicinomyces angewandt werden. Ein Nachteil liegt im relativ grossen Wirtsspektrum, das sich auch auf Nicht-

Schädlinge ausdehnt.

3) Viren: Gegen Aedes-Arten wurde im Oberrheingebiet ein Iridovirus eingesetzt.

4) Insektenpathogene Bakterien: Unter den insektenpathogenen Bakterien nehmen die Bacillen einen wichtigen Rang ein (ARONSON et al., 1986). Bedeutend für die Dipterenbekämpfung sind in diesem Zusammenhang Bacillus sphaericus und Bacillus thuringiensis. Bacillus sphaericus wirkt pathogen auf Larven von Culex-Arten, nicht aber auf Aedes oder Simulium (SINGER, 1981). Ein etwas weiteres Spektrum zeigt Bacillus thuringiensis var. israelensis.

Bacillus thuringiensis ist ein Stäbchen von variierender Länge und einem maximalen Durchmesser von mehr als 1 um. Als ein typischer Vertreter der Bacillus Gruppe ist es grampositiv. B.t. lebt aerob bis fakultativ anaerob und ist peritrich begeißelt und deshalb im vegetativen Zustand sehr beweglich (KRIEG, 1981). Unter Nährstoffmangel leitet B.t. wie alle Bacillen eine Zelldifferenzierung ein und bildet als Überdauerungsorgan im Innern der Zelle eine Endospore aus. Zusätzlich zur Endospore bildet B.t. im Laufe der Sporulation, den für diese Stämme typischen, im Lichtmikroskop deutlich sichtbaren, parasporalen Einschlußkörper, der wegen seines kristallähnlichen Aufbaus auch als parasporaler Kristall oder vereinfacht als Kristall bezeichnet wird. Die Morphologie dieses Kristalls ist bei manchen Stämmen unterschiedlich. Man findet rhombische, unregelmäßig bis rundliche und plättchenförmige Kristalle.

Der erste Bacillus thuringiensis Stamm war 1905 von ISHIWATA entdeckt worden und wurde Sotto-Bacillus benannt. 1911 wurde unabhängig davon von BERLINER aus Mehlmottenlarven, die aus Thüringen stammten, ein ähnlicher Stamm isoliert. 1915 wurde der Stamm von BERLINER aufgrund seiner Herkunft Bacillus thuringiensis genannt (FAST, 1974). Schon frühzeitig erkannte man, daß Bacillus thuringiensis auf manche Schmetterlingslarven toxisch wirkte, wußte zunächst aber nicht,

welche Zellkomponente das toxische Prinzip enthielt. Erst 1954 gelang es ANGUS zu zeigen, daß dieser parasporale Einschlußkörper Ursache der Pathogenität war und das Absterben der Mehlmottenlarven bewirkte.

Diese lepidopteren-aktiven Bacillus thuringiensis-Stämme spielen schon lange eine Rolle in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Einige dieser Stämme werden schon seit längerer Zeit kommerziell produziert und in der Landwirtschaft eingesetzt.

Bacillus thuringiensis var. israelensis wurde 1977 von GOLDBERG und MARGALIT zum ersten Mal in Israel aus toten Mosquitolarven isoliert. Das Ursprungsisolat wurde als Stamm 60A bezeichnet. Nachdem bekannt war, daß dieser Stamm eine neue Varietät aus der Bacillus thuringiensis Gruppe war, wurde er mit dem Namen Bacillus thuringiensis var. israelensis (abg.: B.t.i.) belegt. Dieser neue Stamm erwies sich als potentes Mittel gegenüber Larven einiger Dipterengattungen, darunter die Krankheitsüberträger Aedes, Anopheles, Culex und Simulium. Trotzdem zeigt B.t.i. ein relativ enges Wirtsspektrum. Es umfaßt nach heutigem Wissen etwa 30 Stechmückenarten aus 6 Gattungen (FRANZ und KRIEG, 1982).

Nach der Entdeckung von B.t.i. wurden bald weitere Stämme gefunden, die sich gegen Stechmückenlarven als wirksam erwiesen: Bacillus thuringiensis var. kyushuensis und Bacillus thuringiensis 73-E-10-16 (OHBA und AIZAWA, 1979; PADUA et al., 1980), die schwächer wirksam sind als B.t.i. und der Stamm B.t. PG-14 (IBARRA und FEDERICI, b. 1986), der eine ebenso gute Wirkung zeigt wie B.t.i.. 1983 wurde von KRIEG et al. mit Bacillus thuringiensis var. tenebrionis zum ersten Mal ein B.t.-Stamm entdeckt, der sich für Käferlarven als toxisch erwies. B.t.-Stämme mit toxischer Wirkung auf eine Gruppe verwandter Zielinsekten werden zu einem Pathotyp zusammengefaßt. Interessanterweise decken sich Pathotyp und Kristallform der B.t.-Stämme.

Kristallform und Pathotyp lassen sich zur Klassifizierung der B.t.-Stämme benutzen. Hiernach können zur Zeit die Stämme vier Klassen zugeordnet werden: Pathotyp A umfaßt Stämme, die gegen Schmetterlingslarven toxisch sind und rhombische Kristalle aufweisen, Pathotyp B solche mit Aktivität gegen Dipterenlarven und rundlichen, unregelmäßigen Kristallen und Pathotyp C Varietäten gegen Käferlarven, mit plättchenförmigen Kristallen. Unter Pathotyp ND werden Stämme geführt, für die noch keine Zielorganismen bekannt sind. Daneben lassen sich die B.t.-Stämme noch nach anderen Gesichtspunkten ordnen. Üblich wäre z.B. eine Einteilung nach biochemisch-physiologischen Kriterien. Das heute für B.t. gängige Ordnungsschema ist aber die von DE BARJAC und BONNEFOI 1962 eingeführte Einteilung anhand der Flagellenantigene (DE BARJAC und BONNEFOI, 1973). Danach lassen sich bis heute 21 H-Antigentypen: H1 ... H21 klassifizieren.

Die Bildung der Kristalle erfolgt nur im Laufe der Sporulation, nicht in der vegetativen Zelle. Die Regulation der Expression von Kristallprotein ist sehr wahrscheinlich identisch mit Regulationsmechanismen, die in die Sporulation involviert sind und ereignet sich wahrscheinlich auf Ebene der RNA-Polymerasen (ARONSON und DUNN,1985). Im Gegensatz zu sporulationsspezifischen Enzymen, die chromosomal codiert sind, liegen die Strukturgene für die Kristallsynthese meist auf Plasmiden. Bei B.t.i. liegen die Gene für die Kristallproteine auf einem 75 MD-Plasmid, (GONZALES und CARLTON, 1984), möglicherweise als Transposon (SEKAR und CARLTON, 1985). Der Verlust dieses Plasmids geht einher mit dem Verlust zur Kristallbildung und damit der Pathogenität. Klone von B.t.i., die kein Plasmid mehr besitzen, unterscheiden sich nicht von Bacillus cereus Stämmen, dies gilt auch für andere B.t.-Stämme. Vegetative Zellen von B.t. lassen sich ebenfalls nicht von Bacillus cereus unterscheiden. Somit muß B.t. eigentlich als Varietät von Bacillus cereus angesehen werden (BAUMANN et al., 1984).

Untersuchungen über den Ablauf der Sporulation bei Bacillus allgemein und Bacillus thuringiensis im speziellen, wurden schon vielfach angestellt (ELLAR und LUNDGREN, 1966; OHYE und MURRELL, 1973; BECHTEL und BULLA,a.1976,b.1981; HECKER, 1980; RIEDEL, 1985). Dasselbe gilt auch für den Bau und die Funktion der Endospore (MURELL und WARTH, 1965; MURELL et al., 1969; TIPPER und GAUTHIER, 1972; DWORKIN, 1979).Für Bacillus thuringiensis stellt sich die Sporen- und Kristallbildung folgendermaßen dar (Abb.1), wobei üblicherweise der gesamte Sporulationsablauf in 7 Abschnitte unterteilt wird: Die ersten morphologischen Veränderungen sind nur elektronenmikroskopisch zu erfassen und erstrecken sich auf eine Kondensierung des Cytoplasmas und vor allem der DNA, die als längliches Gebilde zu identifizieren ist (Stadium 1). Stadium 2 ist durch eine inäquale Zellteilung gekennzeichnet; jeder Zellteil erhält ein komplettes Genom. Am Ende dieses Stadiums wird der parasporale Kristall sichtbar. Der kleinere Zellteil wird zur Präspore. Im folgenden wird die zukünftige Präspore von der Mutterzelle umhüllt (Stadium 3), so daß am Ende dieses Differenzierungsschrittes terminal eine ovale Präspore vorliegt, die von zwei Einheitsmembranen umgeben ist. Der parasporale Kristall nimmt während des Einhüllungsprozesses an Größe zu. In Stadium 4 wird zwischen innerer und äußerer Präsporenmembran eine primordiale Zellwand synthetisiert. Zusätzlich beginnt die Entwicklung des Cortex zwischen Zellwand und äußerer Präsporenmembran, sowie weit außerhalb der äußeren Membran, im Sporangium, die Erstellung des Exosporiums. Zu Beginn von Stadium 4 erreicht der Kristall maximale Größe. Das anschließende Stadium 5 zeichnet sich durch Fertigstellung des Exosporiums, der Weiterentwicklung des Cortex und der Ausbildung der äußeren Sporenhüllen aus. In Stadium 6 werden die Sporenschichten fertiggestellt. Die vollentwickelte Spore in der Mutterzelle wird von Stadium 7 repräsentiert. Anschließend lysiert die Sporenmutterzelle und setzt die Spore und den Kristall frei.

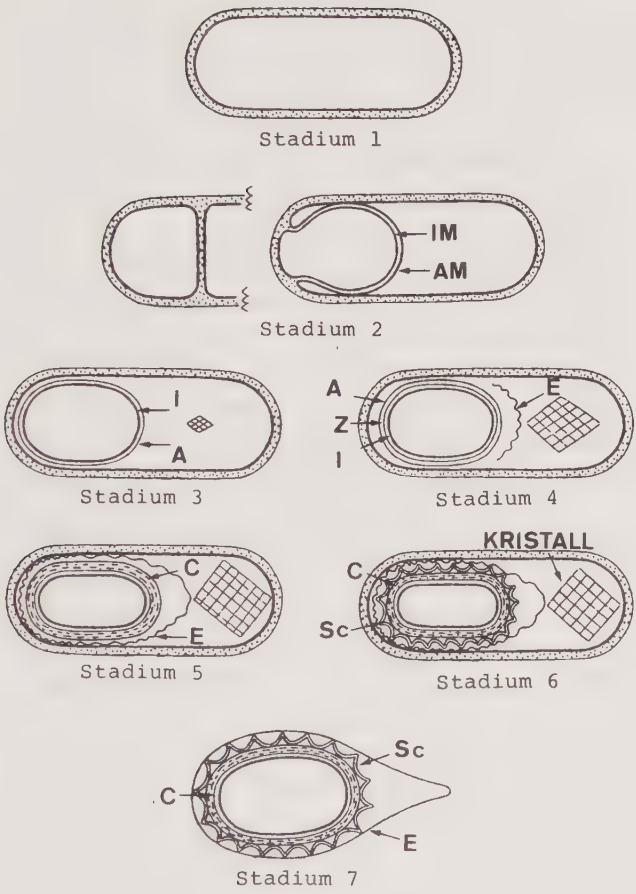


Abb.1: Schematischer Ablauf der Sporulation bei Bacillus thuringiensis. IM: innere Präsporenmembran, AM: äußere Präsporenmembran, Z: primordiale Zellwand, C: Cortex, Sc: spore-coat (äußere Sporenhüllen), E: Exosporium.

Die Fertigstellung des Kristalls erfolgt also schon frühzeitig während des Sporulationsprozesses. Über den Aufbau und die Zusammensetzung des Kristalls, sowie über das eigentlich toxische Molekül, gibt es zur Zeit viele unterschiedliche Auffassungen (YAMAMOTO et al., 1983; THOMAS und ELLAR, 1983; CHEUNG und HAMMOCK, 1985; LEE et al., 1985; INSELL und FITZ-JAMES, 1985; IBARRA und FEDERICI, a.1986). Während man bei Varietäten von lepidopterenaktiven B.t. Stämmen davon ausgeht, daß der Kristall aus nur einem Protein aufgebaut ist, mit einem Molekulargewicht von ungefähr 130 kD (TYRELL et al., 1981), wird dies bei B.t.i. zunehmend in Frage gestellt. Sicher ist, daß der B.t.i. Kristall im Gegensatz zu Kristallen schmetterlingsaktiver Stämme aus mehreren Kristalluntereinheiten zusammengesetzt ist, die sich im Elektronenmikroskop hinsichtlich Größe, Umriß und Elektronendichte unterscheiden. Die Kristalle von B.t.i. sind wie bei allen B.t. Varietäten bei neutralem pH nur unter stark reduzierenden und denaturierenden Bedingungen aufzulösen oder bei hohem alkalischen pH, d.h. größer pH 9. Trotz des relativ niederen Cysteingehalts der Kristallproteine (LÜTHY, 1980), muß die Stabilität durch Disulfidbrücken mitbedingt sein. Werden die Kristalle gereinigt, gelöst und anschließend über Gelelektrophorese aufgetrennt, erhält man bei B.t.i. eine Vielzahl von Proteinbanden. Meist fallen vier Hauptbanden auf: bei etwa 120 kD, 65 kD, 35-40 kD und 25-28 kD. Nach Ergebnissen, die in jüngster Zeit von VISSER et al. (1986) und in unserem eigenen Labor erhalten wurden (BERNHARD et al., 1986; MEYBORG, 1986), kann davon ausgegangen werden, daß das 120 kD-Protein bei B.t.i., wie bei den lepidopterenaktiven Stämmen, das eigentliche Kristallprotein und damit das Prätoxin darstellt. Das Protein mit etwa 65 kD ist davon ein proteolytisches Spaltprodukt, das durch Tätigkeit von kristallassoziierten Proteasen zustande kommt. Die 35-40 kD-Proteine und 25-28 kD-Proteine sind nicht mit dem Kristallprotein verwandt. Bei den etwa 40 kD großen Proteinen handelt es sich, wie BERNHARD et al.(1986) feststellen konnten, um Sporenhüllenproteine. Dem

27 kD-Protein haben VISSER et al. (1986) hämolytische Aktivität zugesprochen.

Geht man von der Annahme einer gleichen Situation aus wie bei lepidopterenaktiven Stämmen, ist das 120 kD Protein, das möglicherweise als Glykoprotein und als Dimer vorliegt, als Prätoxin anzusehen, von welchem das eigentlich wirksame delta-Endotoxin im Insektendarm abgespalten wird. Zur Wirkung kommt es auf folgendem Weg: Als Fraßgift werden die Kristalle von den im Wasser lebenden Stechmückenlarven oral aufgenommen und gelangen in den Mitteldarm (LÜTHY, a.1980, b.1986). Unter den alkalischen Bedingungen des Insektendarms (>pH9) lösen sich die Kristalle auf, und das freigesetzte Prätoxin von 120 kD wird von Proteasen gespalten, wobei das aktive delta-Endotoxin freigesetzt wird. Dabei könnte für die Aktivierung eine Darmprotease oder eine mit dem Kristall assoziierte Protease verantwortlich sein. Ebenso wie Struktur und Größe des aktiven delta-Endotoxins ist auch der Wirkungsmechanismus im Insekt noch weitgehend unbekannt. Relativ sicher ist ,daß das delta-Endotoxin am Darmepithel angreift. Möglicherweise bindet das Toxin an bestimmte Rezeptoren in der Zellmembran des Darmepithels. Durch Umstrukturierung der Lipide soll es dann zur Zerstörung der Zellmembran kommen und zur anschließenden Cytolyse. Mikroskopisch beobachtbar ist eine Hypertrophie der Zellorganellen und wenig später der gesamten Zellen, ein Verschwinden der Mikrovilli nach Verlust der Struktur, sowie eine Vakuolisierung des Cytoplasmas. Letztendlich fallen die einzelnen Zellen des Darmepithels auseinander und Zellyse setzt ein: Das Darmepithel bricht zusammen (CHARLES und DE BARJAC, 1983; LAKHIM-TSROR et al., 1983; PERCY und FAST, 1983; LAURENT und CHARLES, 1984). Nach dem Zusammenbruch des Darmepithels kann alkalischer Darminhalt in die schwach gepufferte, neutrale Hämolymphe eintreten, was zum Tod der Insekten führt (LÜTHY, 1986). Der LD_{50}-Wert für Aedes ägypti liegt mit gereinigten Kristallen und Verwendung von L2-Larven (es gibt vier Larvenstadien L1 - L4) bei $1{,}9 \times 10^{-4}$

ug/ml (TYRELL et al., 1979).

Wegen seiner selektiven Wirkung auf nur wenige Stechmückenarten, seiner guten Dosis-Wirkungsleistung und seiner ökologischen Unbedenklichkeit, ist B.t.i. das zur Zeit beste biologische Schädlingsbekämpfungsmittel gegen Stechmückenlarven. Deshalb finden Präparate auf B.t.i.-Basis nicht nur für die Bekämpfung von Vektoren tropischer Krankheiten Interesse, sondern auch zur Minderung von Stechmückenplagen in Europa, wie sie in einzelnen Gebieten immer wieder vorkommen. So ist in der Oberrheinischen Tiefebene von Zeit zu Zeit mit dichten Mückenschwärmen von Aedes- oder Culex-Arten zu rechnen, die für die dortige Bevölkerung zur Plage werden können. Zur Eindämmung größerer Populationsdichten dieser Stechmücken werden in dieser Gegend schon seit längerer Zeit Bemühungen angestellt. Sogar eigens dafür gegründete Initiativen wurden ins Leben gerufen. Die Heidelberger Arbeitsgruppe "Rheinschnakenbekämpfung" hat es sich zur Aufgabe gemacht, mit umweltschonenden Mitteln die Stechmückenplage unter Kontrolle zu bekommen (KRIEG et al., 1980). Seit der Entdeckung von B.t.i. setzt auch diese Gruppe ihren Schwerpunkt auf Präparate von diesem Organismus.

Auf Grund einer Auflage des Bundesgesundheitsamtes der Bundesrepublik Deutschland soll die Keimzahl in Gewässern so niedrig wie möglich gehalten werden. Damit muß bei einer Bekämpfung der Mückenlarven im Oberrheingebiet der Gehalt an keimfähigen Sporen stark reduziert werden. KRIEG et al. (1980) schlugen dazu die Inaktivierung der Sporen durch kurzwelliges UV-Licht vor. Diese Methode brachte eine Inaktivierungsrate der Sporen um den Faktor 10^{-4}, d.h. 99,99%. Die Kristalle werden dabei nicht geschädigt (KRIEG, 1974). Der Einsatz einer UV-Entkeimungsanlage ist jedoch mit zusätzlichem technischen Aufwand verbunden.

Um den zusätzlichen Aufwand und die damit verbundenen Kosten auszuschalten, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht,

ein keimarmes Präparat auf eine andere Weise zu erhalten: über sporendefekte Mutanten von B.t.i.. Von anderen B.t. Stämmen war schon länger bekannt, daß es nach Mutagenese möglich ist, Stämme zu isolieren, die in der Sporulation gestört sind und keine intakte Spore mehr bilden können, wohl aber noch einen intakten Kristall. NISHIITSUTSUJI-UWO et al.(a.1975, b.1975) beschrieben solche sporendefekten, kristallbildenden Mutanten von lepidopteren-aktiven Stämmen. 1982 beschrieben CHARLES und deBARJAC zum ersten Mal eine sporendefekte Mutante von B.t.i.. Während der zuvorgegangenen Diplomarbeit wurde ebenfalls eine solche Mutante isoliert (WEISSER, 1983). Diese Mutante HA1 ist allerdings in einem späten Stadium der Sporulation blockiert und bildet noch Präsporen, die unter bestimmten Bedingungen nicht lysieren und wieder auskeimen können. Die typischen Sporeneigenschaften, wie z.B. Hitzeresistenz, waren aber verloren gegangen. Da die Kristallbildung schon in einem relativ frühen Stadium beendet ist (CHARLES und deBARJAC, 1982), wurde versucht Mutanten zu gewinnen, die in einem frühst möglichen Stadium der Sporulation blockiert sind, ohne daß die Kristallsynthese beeinflußt wird und deren Präsporen dann später als die Mutterzellen lysieren.

Ziel dieser Arbeit war, die Voraussetzung für ein keimfreies und hochkonzentriertes Kristallpräparat von B.t.i. zu schaffen. Dazu wurde der klassische Weg über einen kombinierten Ansatz von Stammverbesserung und Fermentationsoptimierung gegangen. Über verbesserte sporendefekte Mutanten und einen für diese Stämme optimalen Fermentationsprozeß, sollte ein rentables Verfahren für die industrielle Herstellung von keimfreien, konzentrierten delta-Endotoxin-Kristallen gesucht werden.
Zwei Mutanten wurden in dieser Arbeit intensiver bearbeitet: Die sporendefekte, kristallbildende Mutante HA5, die in einem frühen Stadium der Sporulation blockiert ist und die temperatursensitive Mutante HA9, die als Konsequenz zu den Fermentationserfordernissen aus HA5 weiterentwickelt wurde.

II. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

1. Chemikalien

Abgesehen von den nachfolgend aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck AG, Darmstadt benützt.

1.1. Chemikalien für Nährmedien

Agar für komplexe Medien	Fa. H.Carroux, Hamburg
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Michigan,USA
Backhefe	Fa. Plester, Darmstadt
Caseinpepton	Merck AG, Darmstadt
Cerelose (D-Glucose)	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Distiller soluble	Ciba - Geigy, Basel
Fleischmehl	Ciba - Geigy, Basel
Hafermehl	Maizena Diät GmbH, Heilbronn
Hefeautolysat	IMA, Institut für Molekularbiologie und Analytik, Dreieich-Buchschlag
Hefeextrakt	Oxoid Deutschland, Wesel
Magermilchpulver	Nestle Diät GmbH, München
Maisquellwasser	Bayer AG, Leverkusen
Polyol	BP Chemicals Belgium
Rapsschrot	Fischer Futterwerk GmbH, Böblingen
Sojamehl	Henselwerk Schoenenberger, Magstadt
Sojamehl fettarm	Henselwerk Schoenenberger, Magstadt
Sojamin	Edelsoja GmbH, Hamburg
Stärke	Deutsche Maizenawerke, Hamburg

1.2. Chemikalie für Mutagenese

NTG (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin)	EGA-Chemie AG, Keppler & Reif Steinheim/Albuch, BRD

1.3. Chemikalien für Fermentationsanalytik

Glucose, Merckotest	Merck AG, Darmstadt
Natrium-Hypochlorit	Hedinger GmbH&Co, Stuttgart-Wangen
Phosphat-Test, Diagnostica	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen
Stärke, UV-Test	Boehringer GmbH, Mannheim

1.4. Chemikalien für Kristallisolierung und Elektrophorese

Ammoniumpersulfat	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Acrylamid	dito
Bisacrylamid	dito
Coomassie-Brillant-Blue G-250	dito
Na-Dodecylsulfat (SDS)	dito
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	dito
Triton.X-100	dito

2. Nährmedien

Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121° C im Autoklaven sterilisiert. Der ph-Wert wurde vor dem Sterilisieren mit 3N NaOH bzw. 3 N HCl eingestellt. Zur Herstellung von festen Medien wurde 1,5% Agar zugegeben. Die Gewichtsangaben beziehen sich auf 1 l Wasser. Für Minimalmedien wurde entionisiertes Wasser benutzt.

1) SHS - Medium

10 g Sojamehl fettarm
5 g Stärke
2 g Hefeautolysat
1 g K_2HPO_4
1 ml Spurenelemente
pH 7,4

2) HGP - Medium

5 g Hefeextrakt
5 g Glucose
10 g Caseinpepton
5 g NaCl
10 ml Spurenelemente
pH 7,4

3) PG - Medium

5,0 g Caseinpepton
5,0 g Glucose
0,5 g K_2HPO_4
0,3 g $MgSO_4$
10 ml Spurenelemente
pH 7,4

4) Minimalmedium E

1,0 g Hefeextrakt
1,0 g Glucose
2,0 g Natriumcitrat
2,0 g $(NH_4)_2SO_4$
0,5 g K_2HPO_4
0,3 g $MgSO_4$
10 ml Spurenelemente
pH 7,4

3. Puffer und Lösungen

3.1. Spurenelementelösung für Bacillus thuringiensis

0,5 g	$ZnCl_2$	5,0 g	$MnCl_2$
0,5 g	CuCl	8,0 g	$CaCl_2$
0,5 g	$FeCl_2$	10,0 g	Na_3-citrat

mit entionisiertem Wasser ad 1 000 ml

3.2. SSC - Puffer

150 mM NaCl 15 mM Na_3-citrat pH 7,0

3.3. Lösungen zur Ammoniumbestimmung

Lösung a: 106 mM Phenol und 0,17 mM Na-Nitroprussid
Lösung b: 20 ml Hypochloridlösung und 5,0 g NaOH
mit entionisiertem Wasser ad 1000 ml
Hypochloridlösung: 0,5 ml Hypochlorid und 25 ml H_2O

3.4. Puffer zur Kristallisolierung

Tris - Triton - Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 7,4
0,1 % Triton-X-100

3.5. Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese

Probenpuffer:

10 mM	Tris-HCl pH 7,4	1,0 %	Mercaptoethanol
25 %	SDS	0,02 %	Bromphenolblau

Stammlösungen:

1) 30 g Acrylamid und 0,8 g Bisacrylamid
   mit entionisiertem Wasser ad 1 000 ml
2) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8
3) 10 % SDS
4) TEMED
5) 0,25M Tris-HCl pH 6,8
6) 2 % Ammoniumpersulfatlösung (frisch ansetzen)

Trenngel:		Sammelgel:	
13,4 ml	Lösung 1	3,34 ml	Lösung 1
10,0 ml	Lösung 2	10,0 ml	Lösung 5
0,4 ml	Lösung 3	0,2 ml	Lösung 3
15,3 ml	Aqua.dest. entgasen	6,0 ml	Aqua dest. entgasen
1,0 ml	Lösung 6	0,5 ml	Lösung 6
15,0 ul	Lösung 4	5,0 ul	Lösung 4

Elektrodenpuffer:

0,025 M Tris-HCl pH 8,3
0,192 M Glycin 0,1 % SDS
mit entionisiertem Wasser ad 4 000 ml

Färbelösung für Proteine:

1)			2)		
25	%	Isopropanol	10	%	Isopropanol
10	%	Eisessig	10	%	Eisessig
0,05%		Coomasie Blue	0,005%		Coomassie Blue

Entfärbelösung: 10 % Eisessig

3.6. Fixierlösung für Elektronenmikroskopie

2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3

4. Organismus

Untersuchungsobjekt dieser Arbeit ist Bacillus thuringiensis var. israelensis (abgekürzt: B.t.i.). Der Wildtyp wird als 60A bezeichnet. B.t.i. bildet während der Sporulation dipterentoxisches Delta-Endotoxin. Der Stamm wurde von Herrn Dr. Schnetter vom Zoologischen Institut der Universität Heidelberg bezogen.

4.1. Kulturbedingungen

4.1.1. Wildtyp 60A

Der Stamm wurde auf HGP - Platten überimpft, bis zur Sporulation bei 27°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Langzeitlagerung wurde 60A auf Agar-Schrägröhrchen (3% Agar) gehalten.

4.1.2. Sporendefekte Mutanten

Die Mutanten wurden zur Aufbewahrung lyophilisiert oder in Glycerin tiefgefroren. Arbeitsstämme wurden auf HGP - Platten überimpft, ungefähr 2 Tage bei 27°C inkubiert und danach 2 - 3 Tage bei 4°C aufbewahrt. Spätestens 5 - 6 Tage nach Animpfbeginn wurde wieder auf eine frische Platte überimpft.

4.1.3. Einfrieren bei -80°C

Die Bakterien wurden in HGP - Medium bis in die späte log-Phase hochgezogen und je 2 ml der Kultur in sterile Plastikröhrchen gegeben, in denen 1 ml steriles 90 %-iges Glycerin vorgelegt war. Nach Durchmischen wurden die Zellen in der 30%-igen Glycerinlösung bei -80°C eingefroren.

4.1.4. Lyophilisieren

Die Bakterien wurden wie oben angezogen, abzentrifugiert und das Pellet von 10 ml Kultur in 1 ml steriler 10 %-iger Magermilchsuspension aufgenommen. In Portionen zu je 0,5 ml kam die Zellsuspension in sterile 1 ml Tubengläschen, wurde bei -80°C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Die Gläschen wurden in normale Reagenzgläser gesetzt und mit Glaswatte abgedichtet. Unter Vakuum wurden die Reagenzgläser zugeschmolzen.

4.2. Schüttelkolbenversuche

Die Versuche zur Wachstumsoptimierung wurden, sofern nicht anders angegeben, im 500 ml Erlenmeyer-Kolben mit einem seitlichen Einstich durchgeführt. Die Kolben waren mit 200 ml steriler Nährlösung gefüllt. Angeimpft wurde mit 5 ml einer etwa 15 Stunden alten Vorkultur und bei 27°C auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106, Infors AG, Basel, Schweiz) bei 120 rpm mit einem Auslenkradius von 25 mm inkubiert. Der pH-Wert wurde, falls nicht anders vermerkt, vor der Sterilisation mit 3N NaOH auf 7,4 eingestellt. Vorkulturen wurden mit vegetativen Zellen einer in der Regel etwa 2 Tage alten Platte beimpft. Kolben für Fermentervorkulturen enthielten 250 ml Medium.
Die Versuche bei 43°C wurden im 100 ml Erlenmeyerkölbchen mit einem seitlichen Einstich und 20 ml Medium durchgeführt.

4.3. Fermentation

Die Anzucht im Bioreaktor erfolgte im 10l-, 25l- und 200l-Maßstab.

4.3.1. 10-l - Fermentation

Benutzt wurde ein Fermenter des Typs F 0020, Fa. Chemap AG, Männedorf, Schweiz, mit Blattrührsystem. Der Fermenter wurde mit 10 l Medium gefüllt und in situ sterilisiert (30 min., 121°C). Falls nicht anders vermerkt, wurde mit 250 ml einer etwa 14 h alten Vorkultur beimpft und bei 0,5 vvm, 300 rpm und 28°C fermentiert. Die Schaumbildung wurde durch Zugabe von 3 ml Polyol unterdrückt.

4.3.2. 25-l - Fermentation

Diese Fermentationen wurden im Fermenter vom Typ b/25 (AG für biologische Verfahrenstechnik, Giovanola Freres SA, Monthey, Schweiz) mit Umwurfwurfsystem durchgeführt. In den Fermenter wurden 25 l Medium gefüllt und in situ sterilisiert (30 min., 121°C). Falls nicht anders vermerkt, wurde mit 500 ml einer etwa 14 h alten Vorkultur angeimpft und bei 0,5 vvm, 1200 rpm und 28°C fermentiert. Die Schaumbildung wurde durch Zugabe von 2 ml Polyol unterdrückt.

4.3.3. 200-l - Fermentation

Die Durchführung erfolgte in einem Fermenter Typ b/200 (Giovanola Freres SA, Monthey, Schweiz). 180 l Medium wurden im Fermenter in situ sterilisiert (121°C, 30 min.). Angeimpft wurde mit 20 l einer 6 h alten Vorkultur, die in einem 20-l - Vorfermenter angezogen wurde und anschließend übergepumpt wurde. Die Fermentationsparameter waren 0,5 vvm, 1200 rpm und 28°C. Schaumbildung wurde durch Zugabe von Polyol unterdrückt.

4.4. Ernte der Kristalle

Die Ernte der Kristalle erfolgte durch Zentrifugation. Kleine Volumina wurden in der Sorvall-Zentrifuge im GSA-

Rotor bei 10 000 rpm 10 min. abzentrifugiert, große Volumina wurden in der Durchlaufzentrifuge geerntet.

5. Messen und Regeln einiger Fermentationsparameter

Folgende Parameter wurden bei einer Fermentation ständig aufgezeichnet: Temperatur, Drehzahl und pH - Wert. Bei vielen Fermentationen wurde zusätzlich der Sauerstoffpartialdruck in der Flüssigkeit gemessen. Bei pH - statischer Prozeßführung erfolgte zumeist die Aufzeichnung des Laugenverbrauchs.

5.1. Messung und Regelung der Temperatur

Die Messung der Temperatur erfolgte kontinuierlich mit einem Thermofühler PT 100. Zur Kontrolle war zusätzlich ein Thermometer eingesetzt. Die Regelung erfolgte über einen Thermostat und einen Kühlkreislauf.

5.2. Messung und Regelung des pH - Wertes

Der pH wurde kontinuierlich gemessen. Dazu wurde eine in situ sterilisierbare Elektrode des Typs 465-VT der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz, verwendet. Im 25-l - Fermenter erfolgte die pH - Regelung über einen Regler der Firma Paratronic Typ A 931. Für den 10-l - Fermenter siehe HASENBÖHLER 1978.
Lauge und Säure wurde aus den Vorlagegefäßen mit Hilfe von Membranpumpen (FE 211, Fa. Braun-Melsungen AG), Pumpenköpfe F = 1, zugeführt.

5.3. Messung des pO_2

Der Sauerstoffpartialdruck in der Submerskultur wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Gemessen wurde mit einer in situ sterilisierbaren polarographischen Sauerstoffelektrode vom Typ IL 531 der Firma Ingold, Urdorf-Zürich, Schweiz.

5.4. Bestimmung des Luftvolumens

Zur Bestimmung der das Medium durchstömenden Luftmenge wurde ein Laborgasmeter benutzt (L5-PVC, Fa. Wohlgroth, Zürich, Schweiz).

6. Untersuchung der Fermentationsproben

6.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Ermittlung der Gesamtzellzahl erfolgte mit Hilfe einer Bakterienzählkammer nach Neubauer. Deren Maße pro Kleinquadrat sind: Fläche = $2{,}5 \times 10^{-3} mm^2$, Höhe = $2 \times 10^{-2} mm$; daraus ergibt sich ein Volumen von $5 \times 10^{-5} mm^3$ oder $5 \times 10^{-8} ml$. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, muß also die Zellzahl pro Kleinquadrat mit 2×10^7 multipliziert werden. Ausgezählt wurden immer 4 Großquadrate = 64 Kleinquadrate über die Diagonale der Zählkammer. Jede Probe wurde in der Regel doppelt ausgezählt.

6.2. Lebendkeimzahlbestimmung

Die Proben wurden in SSC - Puffer verdünnt und auf HGP - Platten ausgestrichen. Jede Verdünnungsstufe wurde dreimal ausplattiert.

6.3. Bestimmung der optischen Dichte

In klaren Medien wurde der Wachstumsverlauf der Kulturen auch indirekt über Messung der optischen Dichte verfolgt. Die Messung erfolgte in einem Eppendorf - Spektrallinien - Photometer bei 578 nm Wellenlänge mit einem Hg - Filter. Als Leerwert diente Wasser.

6.4. Naßgewichtsbestimmung

Gleich im Anschluß an die Probenahme wurden 10 ml Kulturflüssigkeit in einem zuvor abgewogenen Plastik-Zentrifugenglas für 15 min. bei 5 000 rpm in der Christ - Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und Resttropfen von Wasser mit Wischpapier vom Rand des Zentrifugenröhrchens abgesaugt, bevor die Flüssigkeit wieder ins Pellet zurücklaufen konnte. Nach erneutem Wiegen ergab sich aus der Gewichtsdifferenz das Naßgewicht.

6.5. Glucosebestimmung

Die Bestimmung der Glucose erfolgte mit einem Reagentiensatz der Firma Merck, Darmstadt. Der Nachweis der Glucose im Kulturüberstand erfolgt auf enzymatischem Weg. Durch Glucose-Dehydrogenase wird Glucose zu Gluconolacton oxidiert. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert. Das entstehende NADH ist proportional zur Glucosekonzentration und wird photometrisch bei 366 nm bestimmt.

6.6. Stärkebestimmung

Der Stärkegehalt im Kulturüberstand wurde mit einem Reagentiensatz der Firma Boehringer, Mannheim bestimmt. Der Nachweis erfolgt enzymatisch. Stärke wird durch Amyloglu-

cosidase zu Glucose gespalten. Die Glucose wird durch ATP mit Hilfe von Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert. Durch Oxidation von Glucose wird NADP zu NADPH reduziert und dieses wird bei 366 nm oder 334 nm im Photometer gemessen.

6.7. Phosphatbestimmung

Die Phosphatbestimmung wurde mit einem Reagentiensatz der Firma Roche Diagnostica durchgeführt. Dabei wird im sauren Milieu durch anorganische Phosphationen aus Malachitgrün-Molybdat-Komplexen Malachitgrün freigesetzt. Die Intensität der auftretenden Farbe ist direkt proportional zur Phosphatkonzentration. Die Absorption wurde bei 578 nm gemessen.

6.8. Ammoniumbestimmung

Die Ermittlung der Ammoniumionenkonzentration wurde nach der Methode von FAWCETT und SCOTT (1960) vorgenommen.In Anwesenheit von Phenol-Natriumnitroprussid und Hypochlorit wird bei alkalischem pH ein blauer Indophenolfarbstoff gebildet, dessen Absorption bei 578 nm gemessen wird.

7. Testorganismus und Biotest

7.1. Testorganismus

Als Testorganismus dienten Aedes ägypti - Larven des frühen vierten Larvalstadiums (L4). Die Eier zur Anzucht der Larven wurden von Herrn Dr. Krieg, BASF, Limburgerhof oder von Herrn Rutschke vom Tropenmedizinischen Institut der Uni. Tübingen bereitgestellt.

7.2. Aufzucht der Larven

Die Eier, die auf Fließpapier abgelegt waren, wurden in eine Wanne mit abgestandenem lauwarmem Leitungswasser getaucht und waren nach wenigen Stunden schlüpffähig. Bis zur Entwicklung des vierten Larvenstadiums wurden die Tiere mit dem Fischfutter Tetramin^{R} gefüttert.

7.3. Aufzucht adulter Tiere

Zur Wiedergewinnung neuer Eier ließ man einigen Larven die Möglichkeit zur Verpuppung und zum anschließenden Ausschlüpfen der Mücken. Die Haltung der Mücken erfolgte in einem Brutkäfig bei 27^{o}C und einer Luftfeuchtigkeit von 80%. Die Tiere wurden mit Zuckerlösung gefüttert. Die Weibchen erhielten als Blutsauger zusätzlich eine narkotisierte Maus. Da die Weibchen ihre Eier bevorzugt an den Rand der mit Wasser gefüllten Wanne legen, wurde dieser mit Fließpapier ausgelegt.

7.4. Biotest

Die Toxizität verschiedener B.t.i.-Präparationen wurde im Biotest an L4 - Larven ermittelt. Testmaterial war das gesamte Kultursediment, das sich am Ende einer Fermentation nach Abzentrifugieren der Kulturbrühe ergab. Als Ausgangswert für die Konzentrationsberechnung diente das Naßgewicht eines Pelletanteils. Die gewünschten Endkonzentrationen wurden durch Verdünnung mit Leitungswasser eingestellt. Dabei muß darauf geachtet werden, daß bei jedem Verdünnungsschritt sorgfältig suspendiert wird. Meistens wurden Verdünnungen zwischen 0,001 ppm und 1,0 ppm hergestellt. Der Test geschah in Urinbechern, die jeweils 100 ml abgestandenes Leitungswasser enthielten, sowie die entsprechende Endkonzentration an kristallhaltigem Kultursediment. Pro

Becher wurden 20 Larven eingesetzt. Die Auswahl orientierte sich in etwa an der Größe der Tiere: ungefähr 5 - 7 mm lang. Die Larven wurden vor dem Test 3 - 4 Stunden in Leitungswasser ausgehungert, erst dann wurden Kristalle zupipettiert. Jede Konzentration wurde in der Regel in zwei Ansätzen getestet. Die Toxizität wurde anhand der verendeten Larven ermittelt.

8. Mutagenese

Die Mutagenesen erfolgten mit NTG (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin), welches in SSC - Puffer gelöst wurde. Die zu mutagenisierenden Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase ungefähr bei einer OD von 4,0 (entspricht etwa 2 x 10^8 Zellen) geerntet und 10 min. bei 5 000 rpm in einer Christ-Zentrifuge abzentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal in SSC - Puffer gewaschen. Um die Zellen auszuhungern wurden sie beim zweiten Waschen 30 min. bei RT in SSC stehen gelassen. Zur Mutagenese wurden die Bakterien so mit dem in SSC gelösten Mutagen versetzt, daß sich im Ansatz eine Endkonzentration von 500 ug NTG/ml ergab. Inkubiert wurde bei 27°C.
Zur Ermittlung einer Überlebenskurve wurde zu verschiedenen Zeiten Probe gezogen und sofort, ohne zu waschen, eine Verdünnungsreihe in SSC auf HGP - Medium ausplattiert.
Zur späteren Isolierung von Mutanten wurde die Mutagenese nach der zuvor ermittelten Inkubationszeit gestoppt, indem 1 ml der mutagenisierten Zellsuspension in 250 ml HGP gegeben wurde. Die Verdünnung wurde als ausreichend zur Beendigung der Mutagenese angesehen. Die Zellen wurden dann so lange inkubiert, bis sie in der späten log-Phase waren, zum Schluß in 30%-igem Glycerin bei -80°C eingefroren und dort bis zur späteren Isolierung aufbewahrt.

9. Isolierung von Mutanten

Zum Auffinden von Mutanten wurden die mutagenisierten Zellen so auf HGP - Platten ausgestrichen, daß pro Platte ungefähr 50 - 100 Kolonien wuchsen.

9.1. Isolierung sporendefekter Mutanten

Eine Vorisolierung sporenloser, kristallproduzierender Mutanten erfolgte zunächst anhand der Koloniemorphologie. Sporenlose Mutanten haben ein transparenteres Aussehen als sporenhaltige Klone. Die eigentliche Selektion erfolgte dann unterm Phasenkontrastmikroskop bei 500-facher Vergrößerung.

9.2. Isolierung temperatursensitiver Mutanten

Die Selektion temperatursensitiver Mutanten geschah durch Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen. Dazu wurden mutagenisierte Zellen ausplattiert und über Nacht bei 27°C inkubiert. Diese Platten dienten als master-plates, von denen aus mit Hilfe der Replica - Technik auf zwei frische HGP - Platten überstempelt wurde. Je eine Platte wurde bei 27°C und bei 43°C inkubiert. Diejenigen Kolonien, die bei 27°C, aber nicht bei 43°C, wuchsen, wurden abgepickt, auf zwei Platten ausgestrichen und erneut bei 27°C und 43°C inkubiert. Klone, die bei 43°C auf Platte nicht wachsen konnten, wurden hinsichtlich ihres Wachstumverhaltens bei 43°C in Flüssigkultur untersucht. Aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften konnte festgestellt werden, ob es sich um lethale ts-Mutanten handelt.

10. Elektronenmikroskopie

10.1. Vorbereitung der Proben

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in HGP - Medium im 10-l-Fermenter bzw. in Schüttelkolben. Zu verschiedenen Zeitpunkten der stationären Phase wurde Probe gezogen. Davon wurden je 1 ml in einer Eppendorf - Tischzentrifuge 5 min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde einmal in SSC - Puffer gewaschen und anschließend in 2,5%-Glutaraldehyd-haltigem 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Die Proben wurden in der Glutaraldehydlösung bei 4°C zwischen 4 - 14 h vorfixiert. Danach wurde abzentrifugiert und das Sediment in 0,1 M Phosphatpuffer wieder resuspendiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C.

10.2. Herstellung und Mikroskopie der Präparate

Die Zellen bzw. Kristalle wurden nachfixiert mit 1% Osmiumtetroxid. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde dehydriert. Auf der 70%-igen Alkoholstufe wurde eine Blockkontrastierung mit 1% Uranylacetat durchgeführt. Nach Einbetten in Epon wurden die Präparate mit dem Ultramikrotom geschnitten und mit Bleiacatat bleikontrastiert. Die Schnitte wurden im Philips EM 201 mikroskopiert und photographiert.

11. Isolierung der Delta-Endotoxin-Kristalle

11.1. Zweiphasensystem

Eine Möglichkeit der Kristallreinigung ist ein Zweiphasen-

system aus Wasser und Tetrachlorkohlenstoff. Diese Methode ist nur für sporogene Stämme sinnvoll, da hierbei Kristalle und Sporen voneinander getrennt werden.
Nach Anzucht und Lyse der Zellen wurde die Kultur bei 10 000 rpm abzentrifugiert. Das gesamte Zellsediment wurde je nach Menge in 1-2 l H_2O aufgenommen, etwa 1:1 mit Tetrachlorkohlenstoff versetzt und die Suspension im Scheidetrichter gut ausgeschüttelt. Aufgrund ihrer mehr hydrophoben Oberflächeneigenschaften gehen die Sporen dabei in die organische Phase (Epiphase). Die Kristalle sammeln sich in der wäßrigen Hypophase. Die organische Phase wurde anschließend nochmals mit H_2O extrahiert, die wäßrige Phase mit CCl_4 nachgereinigt. Der Erfolg der Trennung von Sporen und Kristallen wurde durch Phasenkontrastmikroskopie überprüft. Die wäßrigen Phasen wurden gesammelt, abzentrifugiert und in Wasser nachgewaschen.

11.2. Differentielle Dichtegradientenzentrifugation

Die Stämme wurden bis zur Lyse der Zellen inkubiert. Nach der Ernte im GSA-Rotor wurden die Sedimente zur Entfernung löslicher Proteine zuerst in Wasser, dann einige Male in Tris-Triton-Puffer gewaschen. Dabei wurden die Pellets durch Aufziehen und Ablassen mit einer 10-ml-Pipette sorgfältig suspendiert. Zwischendurch wurden die in Tris-Triton suspendierten Sedimente drei Stunden im Kühlschrank stehen gelassen. Zum Schluß wurde noch einmal in Wasser gewaschen.
Im nächsten Schritt wurden die Pellets mit NaBr auf eine Dichte von 1,36 eingestellt und in der Christzentrifuge bei 5 000 rpm für 15 min. abzentrifugiert. Die Überstände wurden gesammelt und mit den Pellets die Prozedur wiederholt. Dabei gehen die Sporen ins Pellet, die Kristalle in den Überstand. Die Überstände wurden am Schluß 1:1 mit Wasser verdünnt und wieder abzentrifugiert. Die Kristalle werden hierbei von weniger dichten Zelltrümmern getrennt. Mit dieser Methode können noch relativ große Mengen aufgearbeitet werden.

11.3. Dichtegradientenzentrifugation im linearen Gradienten

Um wirklich saubere Kristallpräparationen zu erhalten, müssen die kristallhaltigen Fraktionen in der Ultrazentrifuge über einen Dichtegradienten aufgetrennt werden. Dazu wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers ein Natriumbromidgradient der Dichte 1,0 - 1,4 g/cm^3 vorgegeben. 4 ml einer kristallhaltigen Suspension (50 mg /ml kristallhaltiges Pellet) wurden auf den Gradienten aufgetragen. Es wurde in einer Beckmann Ultrazentrifuge mit einem SW-27 Rotor zwei Stunden bei 20 000 rpm und 20^{o}C zentrifugiert. Es können aber nur geringe Mengen an Kristall gereinigt werden.

12. Gel - Elektrophorese

12.1. Auflösung der Kristalle

Die Kristalle wurden in Mercaptoethanol-SDS-Bromphenolblau-Puffer ph 7,5 für 20 min. bei 95^{o}C erhitzt. Die ungelösten Anteile wurden in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der klare Überstand mit den löslichen Proteinen wurde abgenommen und auf das Gel aufgetragen.

12.2. Elektrophoresebedingungen

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem diskontinuierlichen SDS - Polyacrylamid - Gel mit einem 5%igen Sammelgel und einem 10%igen Trenngel nach der Methode von AMES (1974) und LAEMMLI (1970). Der Elektrodenpuffer bestand aus 25mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS in ention. Wasser ph 8,3. Die Elektrophorese wurde etwa acht Stunden bei 20 mA durchgeführt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte 30 min. in Proteinlösung 1 und anschliessend etwa 15 Stunden in

Proteinlösung 2. Entfärbt und fixiert wurde in 10 % Eisessig. Die Gele wurden ebenfalls in Eisessig aufbewahrt.

III. E R G E B N I S S E

A. STAMMENTWICKLUNG

1. Mutagenese

Um sporendefekte, kristallbildende Mutanten von B.t.i. zu gewinnen, wurden vegetative Zellen des Wildtyps 60A mit NTG mutagenisiert. Der sporendefekte Stamm HA5, der aus dieser Mutagenese hervorging, wurde, zur Isolierung von temperatursensitiven sporendefekten Mutanten, ebenfalls mit NTG weitermutagenisiert. Die Mutagenesen wurden wie unter II.8. beschrieben durchgeführt.
Die Absterbekurven sind in Abb.2 aufgezeichnet. Für weitere Mutagenesen wurden jeweils die Inkubationszeiten gewählt, die 1% Überlebensrate zur Folge hatten, bei 60A also 30 min., bei HA5 10 min.

2. Isolierung kristallbildender sporendefekter Mutanten

2.1. Selektion

Von sporenlosen und sporendefekten Mutanten von Bacillen ist bekannt, daß sie durch eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Koloniemorphologie auffallen: statt milchig-trüben Kolonien ergeben spo$^-$-Mutanten im Stadium der Sporulation glasig-transparente Kolonien (NISHIITSUTSUJI-UWO und EDA, 1975; WEISSER, 1983). Dies erlaubt eine relativ einfache Selektion

auf sporulationsdefekte Klone (Abb.3). Diese Klone sind jedoch größtenteils asporogen, d.h. die Sporulation wird

Abb.2: Überlebenskurve vegetativer Zellen von B.t.i. 60A und HA5 nach Behandlung mit 0,5 mg/ml NTG bei pH 7,0 und 27°C in SSC-Puffer. x-x 60A; o-o HA5.

nicht eingeleitet. Bei den restlichen Stämmen wird die Sporulation teils vor der Kristallbildung abgebrochen, teils nach der Kristallbildung.

Die auffallenden Kolonien wurden im Phasenkontrastmikroskop durchgemustert, um festzustellen ob sie noch Kristall synthetisieren oder nicht. Der überwiegende Teil der anfallenden Stämme war spo^-cry^-. Nur wenige Klone besaßen den gewünschten Phänotyp spo^-cry^+. Das Verhältnis lag bei den vorliegenden Mutagenesebedingungen etwa bei 1:100.

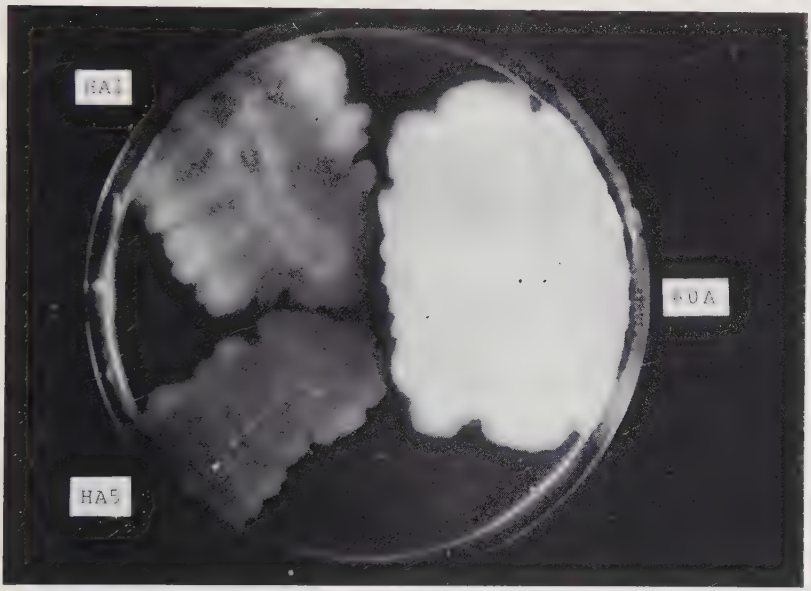


Abb.3: Vergleich der Koloniemorphologie der sporendefekten Mutanten HA5 und HA1 mit dem Wildtyp 60A. Die Kulturen wurden auf HGP-Agarplatten ausgestrichen und befinden sich am Ende der Sporulationsphase. Die Inkubationszeit beträgt vier Tage. Im Gegensatz zum sporogenen Ursprungsstamm 60A, der sich weiß vom dunklen Untergrund abhebt, lassen die transparent wirkenden sporendefekten Mutanten den dunklen Untergrund durchschimmern. Die Mutante HA5 wirkt noch transparenter als die Mutante HA1.

Im Laufe des Screenings wurden einige Mutanten gefunden, die $spo^{-}cry^{+}$ waren, davon wurde eine Mutante weiterbearbeitet. Dieser Stamm wurde im weiteren als HA5 ($spo^{-}cry^{+}$) bezeichnet. HA5 zeigt einen frühen Block in der Sporulation und erwies sich als genetisch stabil. Innerhalb von zwei Jahren konnte keine Reversion beobachtet werden.

2.2. Vergleich der Stämme HA5 und 60A auf zellulärer Ebene

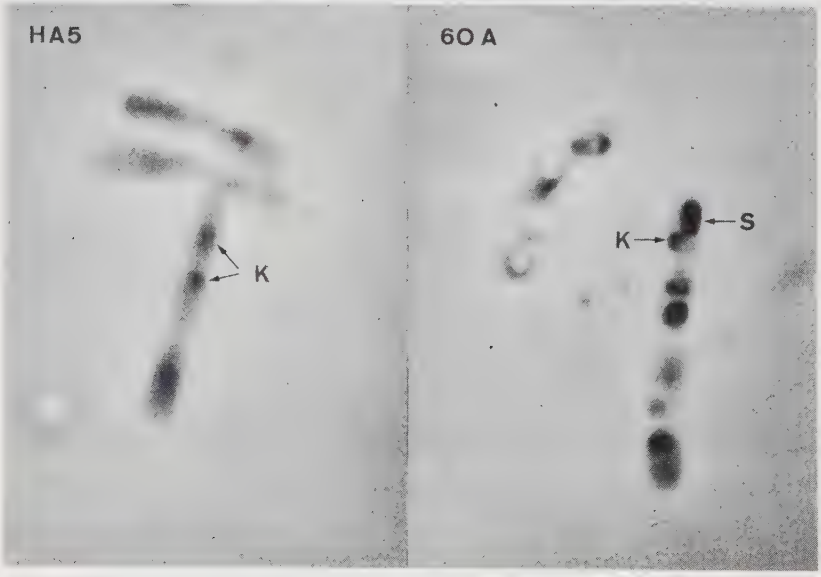


Abb.4: Zellen von HA5 und 60A am Ende der Sporulation, kurz vor Lysebeginn. Die Aufnahmen erfolgten im Phasenkontrastmikroskop bei 850-facher Vergrößerung.
S: Spore, K: parasporaler Kristall.

Während des vegetativen Wachstums sind sporendefekte Mutanten vom Wildtyp 60A morphologisch nicht zu unterscheiden. Dagegen lassen sie sich am Ende der Sporulation im Phasenkontrastmikroskop deutlich voneinander abgrenzen. In Abb.4 sind Zellen von HA5 und 60A zu sehen, wie sie sich im Phasenkontrastmikroskop am Ende des Sporulationsgeschehens präsentieren. Kristallentwicklung und Sporen bzw. Präsporenentwicklung sind abgeschlossen.
In den Zellen beider Stämme sieht man den annähernd rundlichen Kristall. Daneben ist beim Wildtyp 60A deutlich die größere ovale Spore zu erkennen. Bei HA5-Zellen fehlt die Spore völlig. Zwar wird vorübergehend eine Präspore sichtbar, sie verschwindet aber wieder bevor die Zellen lysieren.

2.3. Vergleich der Ultrastruktur sporulierter Zellen von HA5 und 60A

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Ultradünnschnitten lassen die Unterschiede zwischen den Stämmen besser erkennen. Die Abb.5 und 6 zeigen jeweils das Endstadium der Sporen- bzw. Präsporenentwicklung.

Wildtyp 60A (Abb.5): Die Sporen zeigen das für Bacillus-Sporen typische Aussehen. Ein heller, strukturloser Sporenprotoplast, umgeben von einem dunkleren inneren Cortex,auf den der breite, helle, also elektronentransparente äußere Cortex folgt. Dem Cortex aufgelagert sind die wieder dunklen, äußeren Sporenhüllen. Ganz außen in einiger Entfernung wird die Spore locker vom Exosporium umgeben.
Mutante HA5 (Abb.6): Der Ultradünnschnitt läßt erkennen, daß die Sporenentwicklung in einem frühen Stadium der Sporulation abgebrochen ist. Der Sporenprotoplast ist in seiner Struktur nicht vom Mutterzellcytoplasma zu unterscheiden. An Sporenhüllen sind nur die den Sporenprotoplasten umgebenden Membranen zu erkennen: innere und äußere Präsporenmembran.

Nach außen folgt eine hellere Schicht, die gegen das Mutterzellcytoplasma nicht durch Membranen begrenzt ist. Ansätze eines Exosporiums, dessen Auftreten den Anfang von Stadium IV mitmarkiert, sind hier nicht zu sehen, finden sich aber in manchen Bildern (s.Abb.9c). Die Abschnürung der Präspore ist vollkommen und Kernmaterial ist nicht mehr zu erkennen. Man kann deshalb annehmen, daß der Sporulationsprozeß im Übergang Stadium III zu Stadium IV blockiert ist.

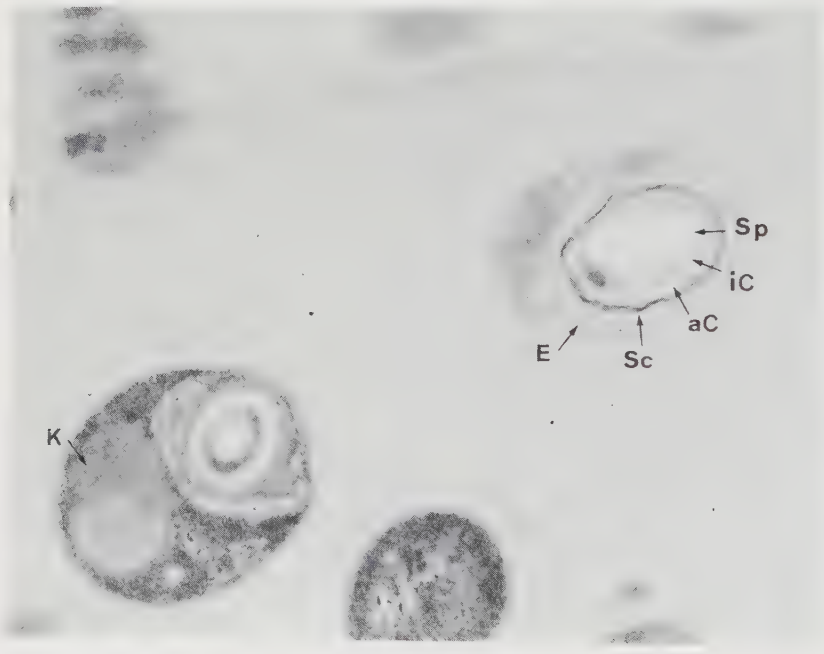


Abb.5: Ultradünnschnitt einer 60A-Zelle mit ausgereifter Spore. Die Spore zeigt einen hellen strukturlosen Sporenprotoplasten (Sp), den dunkleren inneren Cortex (iC), den helleren äußeren Cortex (aC), die dunklen äußeren Sporenhüllen (Sc) und das Exosporium (E). K:Kristall. Vergrößerung: 30 000-fach.

Abb.6: Ultradünnschnitt durch eine HA5-Zelle mit Präspore im ausgereiftesten Stadium. IM: innere Präsporenmembran, AM: äußere Präsporenmembran. Außer diesen Membranen und einem Stück Exosporium, das hier nicht zu sehen ist, macht HA5 keine weiteren Sporenschichten. K: Kristall. Vergrößerung : 40 000-fach.

3. Isolierung temperatursensitiver sporendefekter Mutanten

3.1. Selektion

Die Selektion wurde durchgeführt wie unter II.9.2. beschrieben. Als Selektionstemperatur zur Isolierung von ts-Mutanten

wurde 43°C gewählt, d.h. eine Differenz von 15° zum Wachstumsoptimum bei 28°C. Die Wahl erfolgte willkürlich. Im Brutschrank konnte HA5 auf Festmedium bei dieser Temperatur noch gut wachsen. Zunächst wurden diejenigen Kolonien isoliert, welche auf Agarplatte nur bei 28°C, nicht aber bei 43°C wachsen konnten. Auf diese Weise wurden 48 Klone isoliert und mit den Bezeichnungen ts1 bis ts48 belegt. Diese Kolonien wurden bis zur Sporulation auf HGP-Agarplatten angezogen und dann im Phasenkontrastmikroskop untersucht, ob sie noch in der Lage waren, delta-Endotoxin-Kristalle zu bilden. Nur 23 Stämme konnten noch Kristalle produzieren.

Diese 23 Stämme wurden in HGP - Flüssigmedium hochgezogen, um Wachstum in Submerskultur bei 28°C und bei 43°C zu beobachten. Als Kriterium für Wachstum diente die Zunahme der optischen Dichte der Kulturen.
Die Stämme wurden in einer Vorkultur angezogen und mit jedem Stamm zwei 100 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich und 20 ml Kulturmedium beimpft. Die Animpfdichte wurde so gewählt, daß jedes Kölbchen etwa eine OD von 0,5 aufwies. Die Kölbchen wurden dann getrennt weiter inkubiert: eine Serie bei 28°C, die andere bei 43°C und die Veränderung der optischen Dichte gemessen. Stämme, die bei 43°C eine Abnahme der OD zeigten, wurden ausgewählt.

Für diese Stämme: ts11, ts19, ts33 und ts36 wurde die Lebendkeimzahl nach Temperaturerhöhung auf 43°C am Ende der Sporulation ermittelt. Dazu wurden die Stämme in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 28°C hochgezogen und bis zum Ende der Sporulation inkubiert. Nach Lyse der ersten Zellen wurden die Kulturen ins 43°C-Schüttelbad überführt. Zum Zeitpunkt des Transfers, nach 1, 2 und 3,5 Stunden Inkubation im 43°C -Bad wurde eine Verdünnungsreihe ausplattiert zur Bestimmung der Lebendkeimzahl (Abb.7). Aufgrund der Ergebnisse wurde die Mutante ts19 als lethale ts-Mutante ausgewählt, da nach 2 Stunden 43°C-Inkubation sämtliche verbliebenen vegetativen Zellen abgetötet waren. Die Mutante ts19 bekam die Be-

zeichnung HA9 (spo^-,cry^+,ts43°C).

Abb.7: Abnahme der Lebendkeimzahl verschiedener ts-Mutanten von HA5 nach Temperaturerhöhung von 28°C auf 43°C am Ende der Sporulation. Die vor der Temperaturerhöhung in der Kultur anwesenden vegetativen Zellen, sind Zellen, die nicht sporulierten. Die Anzucht erfolgte in 20 ml HGP-Medium im 100 ml Erlenmeyerkolben.

3.2. Untersuchung der Kristallbildung von HA9 bei 43°C.

Für den Fermentationsprozeß mußte noch geklärt werden, ob

die Temperaturerhöhung auch auf sporulierende Zellen einen Einfluß hat und damit die Kristallbildung gehemmt wird. Bei Ausfall der Kristallsynthese war wichtig zu wissen, ab welchem Zeitpunkt der Sporulation eine Temperaturerhöhung durchgeführt werden kann. Dazu wurde HA9 in Minimalmedium E hochgezogen, um einen möglichst guten Übergang von vegetativem Wachstum in die stationäre Phase zu bekommen, sowie einen einigermaßen synchronen Ablauf der Sporulation zu gewährleisten (WEISSER, 1983). Ab dem Zeitpunkt des Eintritts in die stationäre Phase wurde der Sporulationsablauf mikroskopisch verfolgt und stündlich steril Probe gezogen und davon 20 ml der Kulturflüssigkeit im 100 ml Erlenmeyerkolben ins 43°C-Schüttelbad überführt. Die Proben wurden dort bis zum Ende der Fermentation weiterinkubiert. Nach Ende der Fermentationszeit wurden die 43°C-Proben mikroskopisch auf Anwesenheit von Kristallen untersucht.

Der Versuch zeigte, daß Kristallbildung bei 43°C nicht mehr möglich ist. Wird die Temperatur vor Einsetzen der Kristallbildung erhöht, erfolgt keine Synthese mehr. Erfolgt die Temperaturerhöhung während der Kristallbildung stoppt die Synthese, man erhält kleine Kristalle. Somit darf eine Temperaturerhöhung erst dann erfolgen, wenn die Kristallbildung abgeschlossen ist. Dies ist etwa in Stadium IV der Sporulation der Fall.

B. CHARAKTERISIERUNG DER SPORENDEFEKTEN MUTANTEN HA5 UND HA9

1. Wachstum auf Minimalmedien

Bei der Anzucht von HA5 und HA9 in Minimalmedium E waren die Stämme nicht in der Lage, zu gleicher optischer Dichte

hochzuwachsen wie der Wildtyp 60A (max.OD HA9: 1,8; max.OD 60A: 3,4). Dagegen erreichten die sporendefekten Stämme HA5 und HA9 in einem komplexen Medium wie HGP gleiche optische Dichte bzw. gleiche Zellzahl wie der Wildtyp. Auch beim Ausstreichen auf verschiedenen Minimalmedien zeigten HA5 und HA9 grundsätzlich wesentlich schlechteres Wachstum als 60A. Zwischen HA5 und HA9 konnte kein Unterschied in Bezug auf das Wachstumsverhalten festgestellt werden.

2. Sporulation und Kristallbildung bei HA9

2.1. Beobachtungen zum Sporulationsablauf und zur Kristallbildung im Phasenkontrastmikroskop

Die sporendefekten Mutanten HA5 und dessen Abkömmling HA9 weisen einen frühen Block im Sporulationsablauf auf. Die Entwicklung zur Spore endet nach Ausbildung einer Präspore, die sich bis zur Lyse der Zelle nicht mehr weiterentwickelt und kurz vor der Lyse des Sporangiums selbst lysiert. Im Lichtmikroskop läßt sich ein typischer Ablauf der Sporulation beobachten, mit dem Auftreten einer Präspore und mit deren Verschwinden vor Lyse der Zellen. Im folgenden sollen durch lichtmikroskopische Aufnahmen einige wichtige Stadien, wie sie während der Sporulation im Phasenkontrastmikroskop zu sehen sind, dokumentiert werden. Die Aufnahmen wurden von der Mutante HA9 angefertigt. Die Morphogenese von HA5 und HA9 im Laufe der Sporulation ist nicht unterscheidbar.

Fünf Ausschnitte aus dem Verlauf des Sporulationsprozesses von HA9 sind in Abbildung 8 zu sehen. Die Zellen für die photographischen Aufnahmen wurden in 50 ml HGP-Medium im Schüttelkolben angezogen. Die Zeiten geben die Gesamtfermentationsdauer an. Abb.8a zeigt die lichtmikroskopisch noch undifferenzierte Zelle zu Beginn der Sporulation. Als erstes

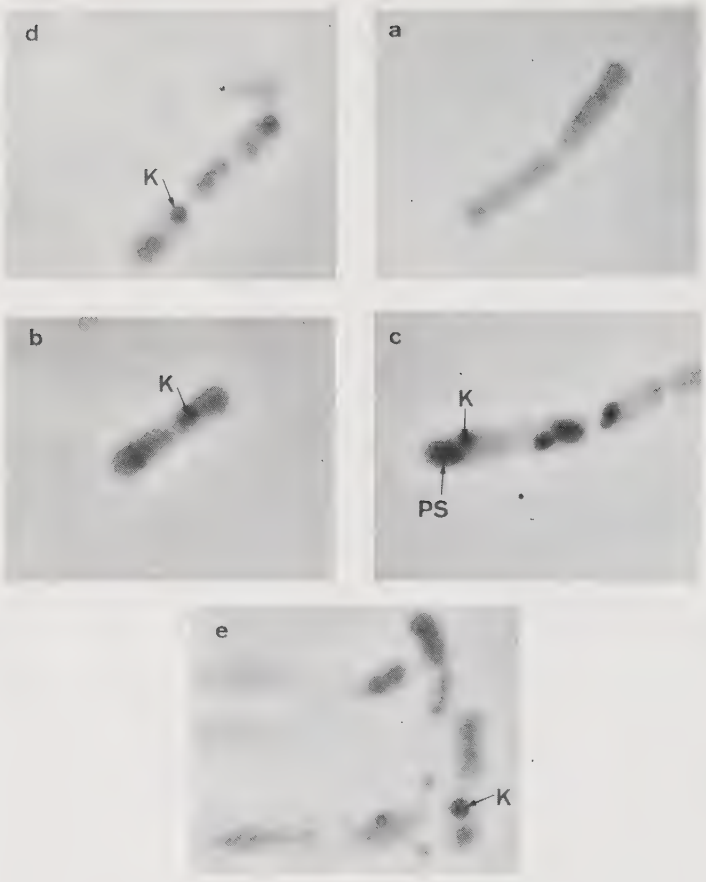


Abb.8: Sporulationsablauf bei HA5 bzw. HA9 im Phasenkontrastmikroskop. Vergrößerung 850-fach.

a. 26h: undifferenzierte Zellen zu Sporulationsbeginn

b. 28h: als erste Struktur der Zelldifferenzierung wird der Kristall sichtbar

c. 30h: Zellen mit Kristall (K) und Präspore (PS)

d. 34h: Zellen mit Kristall und lysierender Präspore

e. 38h: lysierende Zellen

Differenzierungsprodukt erkennt man im Lichtmikroskop den Kristall (Abb.8b), wenig später ist neben dem Kristall die Präspore wahrzunehmen (Abb.8c). In dieser Form präsentieren sich die Zellen einige Stunden lang. Bevor die Zellen zu lysieren beginnen, lysiert die Präspore in der Sporenmutterzelle. Zum Zeitpunkt der Lyse ist nur noch der Kristall in der Zelle zu sehen (Abb.8d und 8e). Nach Lyse der Sporangien werden die Kristalle freigesetzt, das Lichtmikroskop zeigt nur Kristalle als freie Partikel (Abb.13).

2.2. Beobachtungen zum Sporulationsablauf und zur Kristallbildung im Elektronenmikroskop

Um einen detaillierteren Überblick über den Sporulationsablauf von HA9 zu bekommen, wurde eine Serie von Ultradünnschnitten zu verschiedenen Zeitpunkten der Sporulation angefertigt.

Die ersten drei Stadien der HA9-Sporulation lassen sich nicht vom Wildtyp unterscheiden (siehe Einleitung). Ab Ende Stadium III nimmt die Sporulation von HA9 dann einen anderen Verlauf, denn mit Beginn von Stadium IV endet die Entwicklung der Spore. Ansätze eines Exosporiums, typisches Kennzeichen des beginnenden Stadiums IV, sind zu sehen. Ansonsten werden keine weiteren Sporenschichten mehr gebildet. Der Kristall hat zu dieser Zeit sein endgültiges Aussehen erreicht. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Zuordnung zu normalen Sporulationsstadien nicht mehr möglich. Im weiteren Verlauf der "Sporulation" löst sich die Präspore mit ihrer inneren Membran von der äußeren Präsporenmembran ab, wodurch zwischen beiden Membranen ein immer größerer Zwischenraum entsteht. Im weiteren Verlauf lassen die Aufnahmen den Schluß zu, daß zuerst die äußere Präsporenmembran abgebaut wird und dabei Mutterzellcytoplasma in den Hohlraum zwischen beide Membranen eindringen kann. Erst dann kommt es zu einer Lyse der inneren Präsporenmembran, wodurch sich Mutterzell-

cytoplasma und Präsporencytoplasma vermischen können. Erst nachdem die Präspore lysiert ist, kommt es zur Lyse der Sporenmutterzelle, wobei nur noch Kristalle freigesetzt werden.

Abb.9: Ultradünnschnitte von sechs Stadien aus der Sporulation von HA9. Sp: Sporenprotoplast, IM: innere Präsporenmembran, AM: äußere Präsporenmembran, E: Exosporium, K: Kristall. Vergrößerung: a. 20 000-fach, b.-f. 30 000-fach.

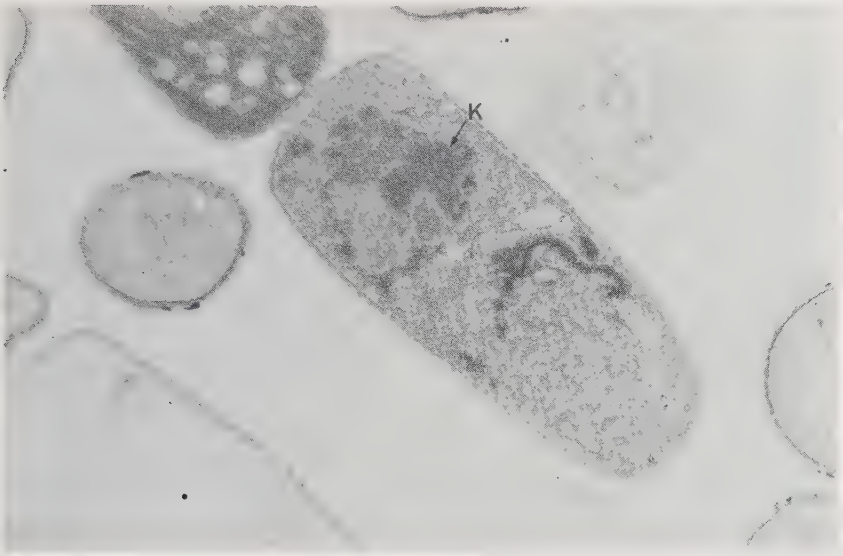
a: Ausbildung des Präsporenseptums (S) und Einhüllung der Präspore. K: Kristall

b: Präspore mit innerer (IM) und äußerer (AM) Präsporenmembran. K: Kristall

c: Die innere Präsporenmembran (IM) löst sich von der äußeren Präsporenmembran (AM). E: Exosporium, K: Kristall

d: Weiteres Auseinanderweichen von innerer (IM) und äußerer (AM) Präsporenmembran. Sp: Sporenprotoplast, E:Exosporium

e: Lyse der äußeren Präsporenmembran. K: Kristall



f: Lyse der inneren Präsporenmembran und des Präsporen-protoplasten. K: Kristall

3. Entwicklung aud Aufbau der parasporalen Kristalle

Hinsichtlich der Kristallentwicklung und der Morphologie des fertig ausdifferenzierten parasporalen Kristalls sind zwischen dem Wildtyp 60A und den sporendefekten Mutanten keine Unterschiede festzustellen (Abb.10). Der Kristall tritt erstmals während Stadium II der Sporulation auf und besteht zu diesem Zeitpunkt in der Regel aus zwei Untereinheiten. Nach Vollendung der Kristallbildung zu Beginn des Stadiums IV ist der Kristall aus mehreren, mindestens aber drei Segmenten aufgebaut und von einer Hülle umgeben, die sich nicht als Einheitsmembran identifizieren läßt. Die einzelnen Segmente sind von unterschiedlicher Größe, Gestalt und elektronenoptischer Dichte, wobei Klassen gleichartiger

Segmente auftreten.

Zum Vergleich der Dichte der parasporalen Kristalle aus den sporendefekten Mutanten mit denen aus dem Wildstamm 60A, wurden die Kristalle wie in II.12 beschrieben vorgereinigt und anschließend im isopyknischen NaBr-Gradienten in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Der NaBr-Gradient wies eine Dichte von 1,0 - 1,4 g/cm^3 auf. Die Zentrifugation erfolgte in einem SW-27-Rotor bei 20000 rpm für 2 Stunden bei 20^{o}C. Die Kristalle aller Stämme bildeten auf derselben Höhe des Gradienten eine Bande aus (Abb.11), so daß geschlossen werden kann, daß die Kristalle der sporendefekten Mutanten in ihrem physikalischen Aufbau unverändert sind, sie haben zumindest gleiche Dichte. Da auch morphologisch keine Unterschiede festzustellen sind (Abb.10a-c) und die Aktivität keine Einbußen zeigte, sind die Kristalle von HA5 und HA9 nicht oder nur unbedeutend von der Mutation betroffen.

Parasporale Kristalle von B.t.i. sind bei normalem pH in wässrigen und den üblichen organischen Lösungsmitteln nicht löslich. Um die Proteine in Lösung zu bringen, benötigt man einen hohen pH, größer pH 9, oder stark reduzierende und denaturierende Bedingungen. Bevor die den parasporalen Kristall aufbauenden Proteine in der Elektrophorese aufgetrennt werden können, müssen die Kristalle aufgelöst werden. Im vorliegenden Fall wurden dazu die Kristalle in SDS-Mercaptoethanol-Puffer pH 7,5 gegeben und 20 min. bei 95^{o}C gekocht. Dabei geht ein Großteil der Proteine in Lösung. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert und der klare Überstand bis zum Gebrauch eingefroren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel. Die Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 5%, im Trenngel 10%.

Die Auftrennung liefert beim Wildtyp 60A eine Serie von Proteinen zwischen etwa 20 kD und 120 kD, wobei vier Proteinbanden stärker ausgeprägt sind: in den Regionen von

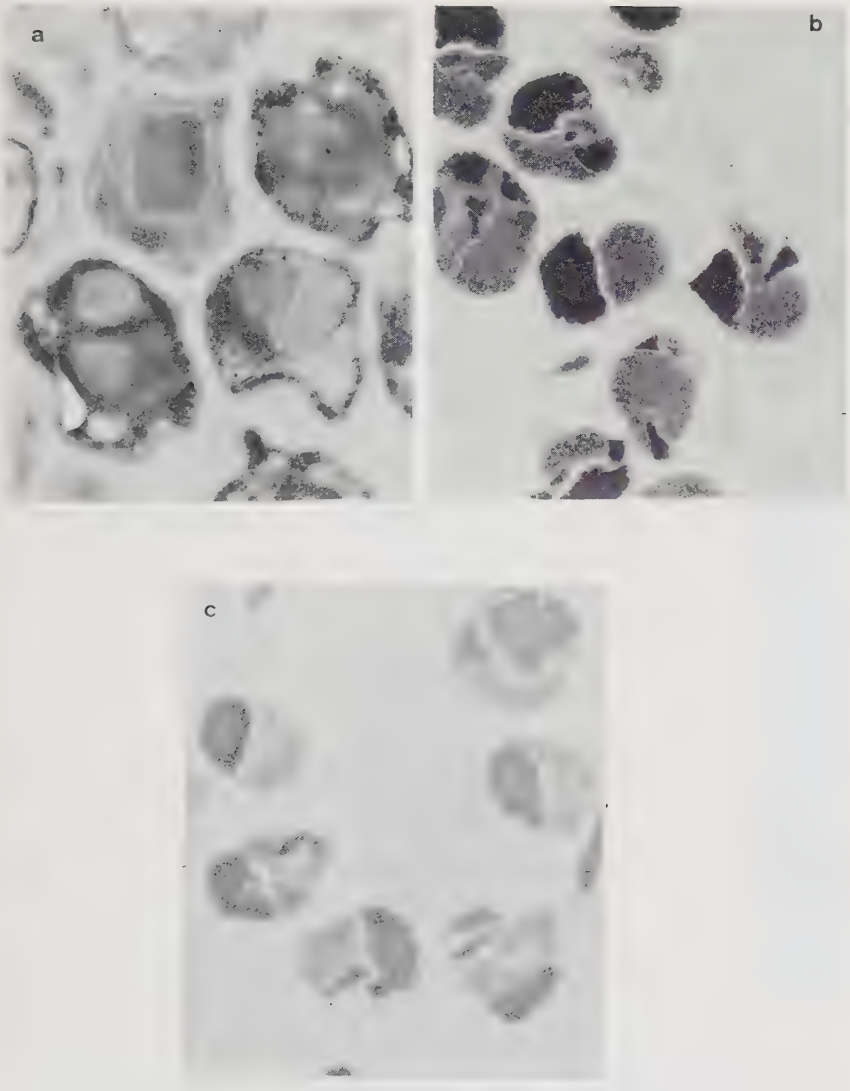


Abb.10: Ausdifferenzierte parasporale Kristalle von 60A (a) (noch in den Sporangien); HA5 (b) und HA9 (c).

Abb.11: Auftrennung der Kristalle im linearen Natriumbromidgradienten mit der Dichte 1,0 - 1,4 g/cm^3 in der Ultrazentifuge bei 20 000 rpm, 2 h, 20°C. K:Kristalle, S:Sporen; N: nicht identifiziert. Die Zahlen geben den Abstand in cm an.

120 kD, 70 kD, 40 kD und 28 kD. Das 120 kD-Protein, das 70 kD-Protein und die Proteine bei etwa 28 kD sind sowohl bei 60A, wie auch bei den sporendefekten Mutanten HA5 und HA9 zu sehen. Interessanterweise fehlt aber den Stämmen HA5 und HA9 die Proteinbande bei 40 kD (Abb.12). Dies kann als weiterer Beweis dafür gelten, daß es sich bei dem 40 kD-Protein nicht um ein proteolytisches Abbauprodukt des 120 kD-Protein handelt, sondern um ein Protein bzw. Proteine, die nicht aus dem Kristall stammen. Mittlerweile wurde festgestellt, daß das 40 kD-Protein ein spore-coat-Protein ist (BERNHARD et al., 1986) und deshalb bei den sporulationsdefekten Mutanten HA5 und HA9 nicht existieren kann, da diese Stämme nicht mehr in der Lage sind typische Sporenhüllen, wie spore-coat zu bilden.

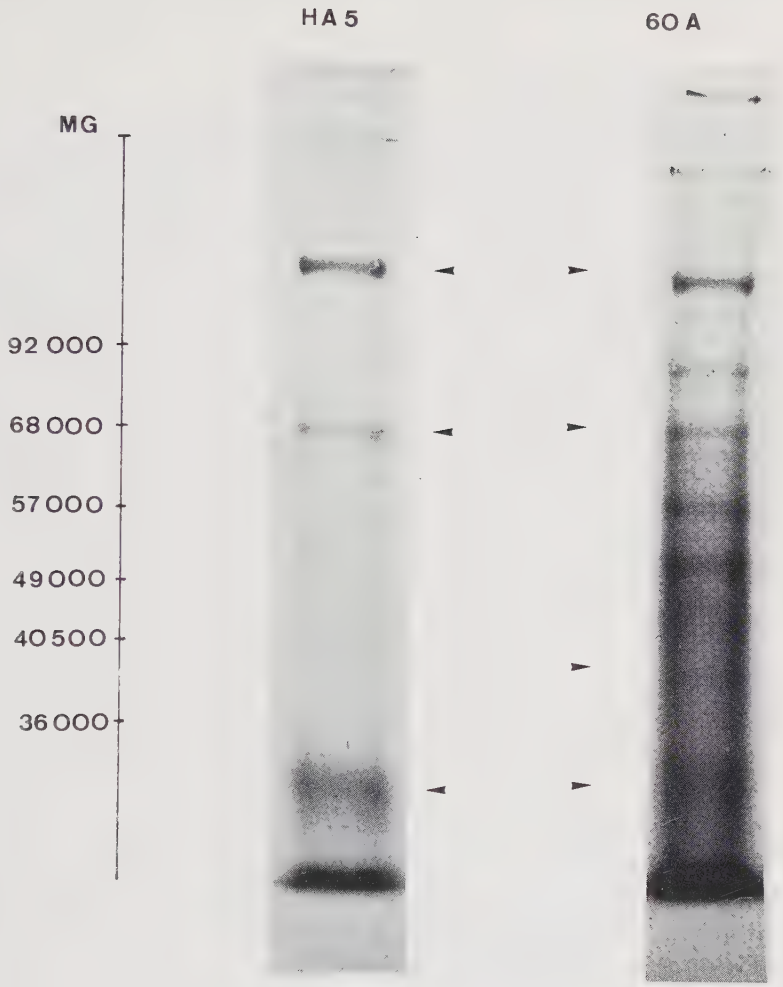


Abb.12: Auftrennung der Kristallproteine von HA5 und 60A im SDS-Polyacrylamid-Gel. Die Kristalle wurden in SDS-beta-Mercaptoethanol pH 7,5 aufgelöst und über ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. MG: Molekulargewichte der Standardproteine.

4. Vergleich der sporendefekten Mutanten mit dem Wildtyp 60A im Biotest

Von den sporendefekten Mutanten HA5 und HA9 war eine höhere spezifische Aktivität zu erwarten, da im Kultursediment sich keine Sporen mehr befinden, sondern nur noch Kristalle und Membranfragmente, sowie bei HA5 einige vegetative Zellen. Um dies zu verifizieren, wurden die Mutanten HA5 und HA9, sowie der Wildtyp 60A parallel unter gleichen Bedingungen angezogen und später in ebenfalls parallelen Ansätzen getestet.

Die Anzucht erfolgte im 10-l-Fermenter in HGP-Medium. Für den Biotest wurden einige Proben in der Christzentrifuge geerntet, da hier die Verluste geringer sind als in der Durchlaufzentrifuge. Die Mutante HA9 wurde vor der Ernte 3 Stunden auf 43°C erhitzt. Getestet wurden für jeden Stamm zwei verschiedene Proben, die jeweils das Kultursediment von 10 ml Kulturflüssigkeit waren. Von jeder Probe wurden Konzentrationen zwischen 1 ppb und 1 ppm, bezogen auf das Naßgewicht des Kultursediments, getestet. Jede Konzentration wurde doppelt angesetzt. Pro Ansatz wurden 20 Larven getestet, die aus einer gleichen Anzuchtreihe stammten. Die Mutante HA1 wurde hier nicht mitgetestet. Die Werte stammen aus einer anderen Versuchsreihe, die unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden war. Bestimmt wurde die prozentuale Mortalität der Larven für die Präparationen der verschiedenen Stämme bei unterschiedlichen Konzentrationen. Die LD_{50}-Werte wurden durch Auftragen in ein halblogarithmisches Koordinatenkreuz ermittelt.

Die Ergebnisse (Tab.1) für die Stämme HA5, HA1 und 60A entsprechen den Erwartungen. HA1 produziert nur noch eine Präspore, die im Kultursediment weniger Raum einnimmt als die reife Spore von 60A oder z.T. lysiert; dadurch sind die Kristalle stärker konzentriert und die Aktivität pro Gewichtseinheit nimmt zu. Beim Stamm HA5 kommt es durch die

Tab.1: Abhängigkeit der Mortalität von Aedes-ägypti L4-Larven von der Konzentration parasporaler Kristalle aus verschiedenen B.t.i.-Stämmen.

	Prozentuale Mortalität der Aedes-Larven bei Einsatz von Kultursediment der Stämme:			
Konzentration an Sediment	HA9	HA5	HA1	60A
1 000 ppb	100%	100%	100%	100%
500 ppb	100%	100%	100%	100%
300 ppb	100%	100%	100%	80%
100 ppb	100%	100%	80%	40%
70 ppb	90%	95%	-	30%
50 ppb	60%	80%	30%	10%
30 ppb	30%	50%	-	0%
10 ppb	25%	30%	10%	0%
7 ppb	10%	25%	-	0%
5 ppb	10%	5%	0%	0%
3 ppb	5%	5%	-	-
1 ppb	0%	0%	-	-
LC_{50}	22 ppb	19 ppb	46 ppb	140 ppb

völlig fehlende Präspore zu einer noch stärkeren Konzentration der Kristalle, die spezifische Aktivität erhöht sich nochmals. Bei der Mutante HA9 wäre eine weitere geringe Steigerung zu erwarten, denn vegetative Zellen, die bei den anderen Stämmen z.T. noch im Pellet vorkommen, fehlen hier ebenfalls. Darauf deuten auch die Naßgewichte hin (NG/ml; 60A: 133 mg, HA5: 88 mg, HA9: 64 mg,). Die mikroskopischen Aufnahmen am Ende der Fermentation, hier im Anschluß an Fermentationen in SHS-Medium, zeigen ebenfalls, daß sich nach einer HA9-Fermentation mit anschließender Temperaturerhöhung praktisch nur noch Kristalle im Kultursediment befinden (Abb.13). Bei einzelnen HA9-Präparationen lag dann

auch die spezifische Aktivität höher als bei HA5, meist aber war sie niedriger. Ein Grund dafür könnte eine zu frühe Temperaturerhöhung sein, vor Fertigstellung aller parasporalen Kristalle oder aber Ungenauigkeit im Biotest.

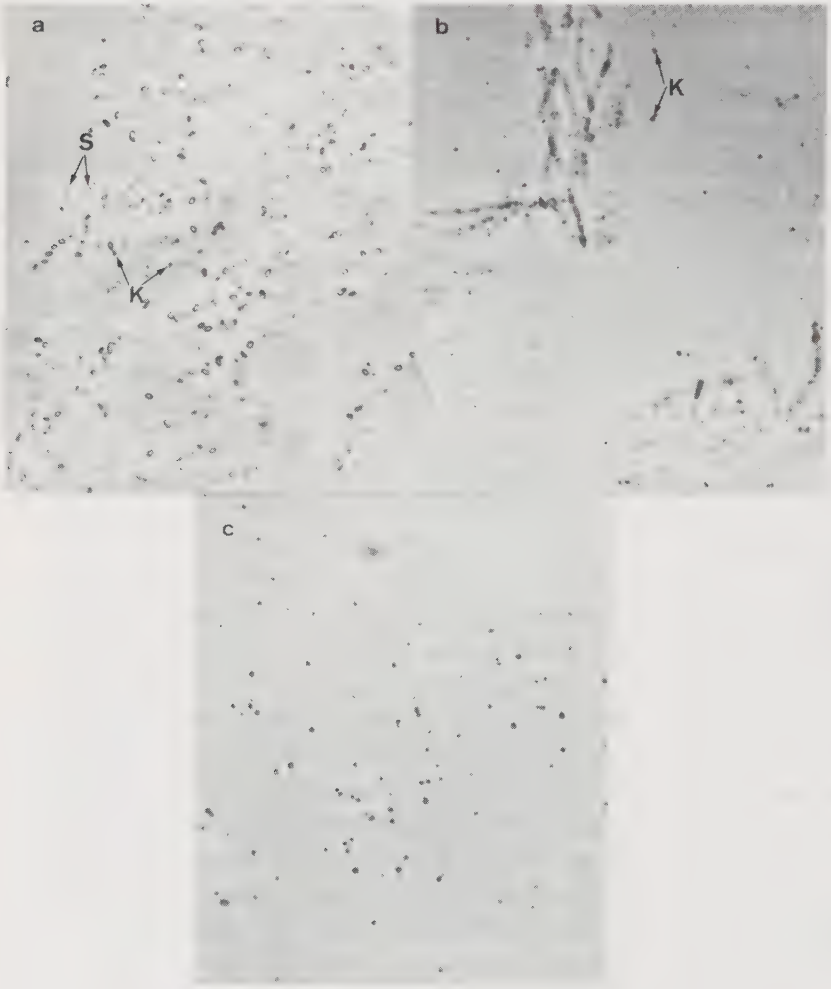


Abb.13: Kulturen zum Zeitpunkt der Ernte; a: 60A, b: HA5; c: HA9 (vier Stunden nach Temperaturerhöhung). K: Kristalle, S: Sporen.

5. Stammpflege

Bacillus Stämme sind normalerweise relativ leicht aufzubewahren. Wegen ihrer Fähigkeit zur Sporenbildung braucht man sie nur bis zur Ausbildung reifer Sporen auf Agarplatten oder Agarschrägröhrchen anzuziehen und kann sie dann monatelang so lagern.
Sporendefekte B.t.i.- Mutanten auf Agarplatten müssen ungefähr alle 4 - 6 Tage überimpft werden. Die Kolonien werden auf HGP-Platten ausgestrichen, 2 Tage bei 27°C bebrütet und anschließend etwa 2 - 4 Tage im 4°C-Kühlraum aufbewahrt. Nach längerer Aufbewahrung sind die Zellen nicht mehr lebensfähig. Werden die Kulturen länger als 2 Tage bei 27°C inkubiert, fangen die Zellen in der Mitte des Ausstrichs bereits an zu "sporulieren".

Hin und wieder wurden Verdünnungsausstriche angelegt und Zellen ausgeklont. Dabei wurde ein einziges Mal ein Klon von HA5 entdeckt, der die Fähigkeit zur Kristallbildung verloren hatte. Ansonsten wurden in etwa zwei Jahren keine Veränderungen beobachtet. In vielen Ausstrichen tauchen immer wieder innerhalb von Arealen "sporulierter" Zellen Kolonien vegetativer Zellen auf. Werden diese Zellen wieder ausgestrichen, verhalten sie sich wie eine normale HA5 - bzw. HA9 - Kultur. Offensichtlich kommt es auf HGP-Agarplatten dazu, daß einige vegetative Zellen nicht in die Sporulation eintreten. Auf Minimalmedium wurde ein solches Verhalten nicht beobachtet.

Um die Stämme über längere Zeit aufzubewahren, wurden sie in 30%-Glycerin tiefgefroren oder lyophilisiert.

C. FERMENTATION

Stammentwicklung und Fermentationsoptimierung erfolgten parallel. Die Weiterentwicklung von HA5 zu HA9 ergab sich aus dem Fermentationsverhalten von HA5. In komplexen Medien sporulieren nicht alle Zellen. Ein gewisser Prozentsatz der Zellen bleibt während der stationären Phase in vegetativem Zustand. Nach Lyse der Sporangien werden Substrate freigesetzt, so daß die vegetativen Zellen erneut hochwachsen können. Abb.14 zeigt das kryptische Wachstum von HA5-Zellen anhand des pO_2-Verlaufs. Bei der Mutante HA9 wird dies durch eine Temperaturerhöhung am Ende der stationären Phase verhindert. Die Stämme 60A, HA5 und HA9 verhielten sich beim Fermentieren in komplexem Medium prinzipiell gleich.

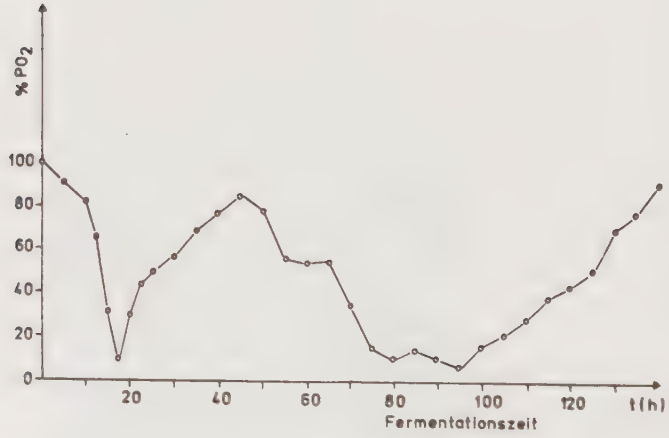


Abb.14: pO_2-Verlauf einer HA5-Fermentation im 10-l-Blattrührfermenter mit 1% Magermilch, 0,5% Stärke, 0,5% Hefeautolysat und 0,1% Spurenelementelösung als Medium. Drehzahl: 250 rpm; Belüftung: 0,5 vvm.

1. Entwicklung eines Komplexmediums zur B.t.i. - Fermentation

1.1. Veränderung von HGP-Medium

Eine erste Optimierung eines komplexen Mediums wurde mit der Methode der griechisch-lateinischen Quadrate (AUDEN et al., 1975) durchgeführt. Hierbei wurden keine besseren Ergebnisse als mit HGP-Medium, welches üblicherweise im Labor als Vollmedium für die B.t.-Anzucht benutzt wird, gefunden. Daraufhin wurden die Bestandteile des HGP-Mediums durch billigere Nährstoffe ersetzt. Da B.t.i. über Amylasen verfügt, wurde Glucose durch Stärke ersetzt. Caseinpepton wurde durch Sojamehl, Hefeextrakt durch Hefeautolysat ersetzt. Da in der Fermentationsanalytik einer 60A- und HA5-Fermentation ein starker Phosphatverbrauch festgestellt wurde, und Kalium als wichtiges Element für die Ausbeute an delta-Endotoxin beschrieben wird (WAKISAKA et al., 1982), wurden noch 0,1% K_2HPO_4 zugesetzt. Wie Versuche zeigten, konnte auf NaCl verzichtet werden. Die Konzentration der Spurenelementelösung konnte von 1% auf 0,1% gesenkt werden, ohne daß das Wachstum oder die Sporulation bzw. die Kristallbildung beeinflußt wird.

1.2. Einfluß von Hefeautolysat- und Sojamehlkonzentration

Da die organische Stickstoffquelle für einen stark proteolytischen Organismus wie B.t.i. besonders wichtig ist, auch in Hinsicht auf die zu bildenden Kristallproteine, wurde zunächst der Einfluß von Hefeautolysat und Sojamehl untersucht.
In Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß Hefeautolysat bzw. Hefeextrakt einen positiven Einfluß auf die Zellausbeute hat. Deshalb wurden verschiedene Konzentrationen an Hefeautolysat angeboten und in einigen Medien statt Hefeautolysat Ammoniumsulfat als anorganische Stickstoffquelle.

Tabelle 2 zeigt, daß schon geringe Mengen Hefeautolysat (0,2%) den Zellertrag fördern. Ammoniumsulfat hat in den getesteten Konzentrationen einen negativen Einfluß.
Alle Zellzahlen wurden in der Bakterienzählkammer bestimmt.

Tab.2: Zellzahlen von HA5 bei verschiedenen Konzentrationen von Hefeautolysat bzw. Ammoniumsulfat.
Grundmedium: 0,5% Stärke, 0,1% K_2HPO_4 und 0,1% Spurenelementelösung; 1% bzw. 1,5% Sojamehl und x% Hefeautolysat bzw. $(NH_4)_2SO_4$.

Sojamehl-konzentration in %	Hefeautolysat-konzentration in %	$(NH_4)_2SO_4$-konzentration in %	Zellzahl/ml
1,0	0	0	$9,1 \times 10^8$
1,5	0	0	$9,5 \times 10^8$
1,0	0,5	0	$2,2 \times 10^9$
1,0	0,2	0	$1,8 \times 10^9$
1,0	0	0,2	$4,0 \times 10^8$
1,0	0	0,1	$4,6 \times 10^8$

Bei verschiedenen Konzentrationen an Sojamehl ergibt sich zwischen 0,5% und 2% Sojamehl eine Steigerung des Zellertrags (Tab.3). Allerdings erhöht sich mit der Zellausbeute auch stark die Fermentationsdauer. Bei allen Konzentrationen gehen etwa 5% - 10% der Zellen nicht in die Sporulation über. Dieses Phänomen konnte auch durch Erhöhung der Spurenelemente, und damit des sporulationswichtigen Mangans, nicht überwunden werden. Die positive Stärkereaktion bei niederen Sojakonzentrationen könnte den Schluß zulassen, daß hier die N-Quelle wachstumslimitierend wirkt. Weitergearbeitet wurde zunächst mit einer Sojamehlkonzentration von 2%.

Tab.3: Zellausbeuten für B.t.i.60A bei verschiedenen Sojamehlkonzentrationen. Zusätzlich wird der Zeitabschnitt angegeben, in welchem die ersten Anzeichen von Sporulation zu sehen sind. Reststärke wurde mit Lugolscher Lösung nachgewiesen. HA5 ergab etwa gleiche Ergebnisse. Medium: x% Sojamehl; 0,5% Stärke; 0,2% Hefeautolysat; 0,1% K_2HPO_4; 0,1% Spurenelementelösung.

Konzentration Sojamehl in %	Zellzahl/ ml	Sporulationsbeginn	Stärkereaktion
0,5	$6,5 \times 10^8$	< 18h	positiv
1,0	$1,5 \times 10^9$	< 18h	positiv
1,5	$1,8 \times 10^9$	20h - 38h	positiv
2,0	$2,3 \times 10^9$	20h - 38h	negativ
3,0	$2,2 \times 10^9$	48h - 62h	negativ
4,0	$2,5 \times 10^9$	3d - 4d	negativ
5,0	$2,8 \times 10^9$	4d - 5d	negativ
10,0	$1,8 \times 10^9$	5d - 6d	negativ

1.3. Variation der Stärkekonzentration

In einem Medium mit 2% Sojamehl und 0,5% Stärke ist mit Lugolscher Lösung keine Reststärke mehr zu finden. Deshalb wurde untersucht, ob durch Erhöhung der Stärkekonzentration eine weitere Steigerung der Zellzahl zu erreichen ist.
Tabelle 4 zeigt, daß durch Heraufsetzen der Stärkekonzentration keine Erhöhung der Zellzahl zu erreichen ist. In allen Ansätzen mit mehr als 0,5% Stärke ist zudem in der stationären Phase eine deutliche Stärkereaktion zu registrieren. Mit zunehmender Konzentration an Stärke und dem damit veränderten C:N-Verhältnis treten in den Zellen zudem vermehrt pHB-Grana auf, die im Kultursediment unerwünscht sind. Die

Stärkekonzentration von 0,5% wurde beibehalten. In allen Ansätzen wurden etwa 10% nicht-sporulierte Zellen gefunden.

Tab.4: Zellzahlen in Abhängigkeit von der Stärkekonzentration beim Stamm 60A (für HA5 gelten etwa gleiche Werte).
Medium: 2% Sojamehl, x% Stärke, 0,2% Hefeautolysat, 0,1% K_2HPO_4, 0,1% Spurenelementelösung.

Konzentration Stärke in %	Zellzahl/ml
0,5	$1,9 \times 10^9$
1,0	$2,0 \times 10^9$
2,0	$2,1 \times 10^9$
4,0	$2,2 \times 10^9$
5,0	$2,0 \times 10^9$

1.4. Ersatz von Sojamehl durch andere N-Quellen

Bisher waren nur drei komplexe N-Quellen in einem ersten Test untersucht worden. In einer weiteren Versuchsreihe wurde Sojamehl durch einige andere preiswerte Eiweißlieferanten ersetzt. Dabei zeigte sich, daß die Sojaprodukte die besten Ergebnisse lieferten (Tab.5). Einzig Fleischmehl erreichte ähnlich gute Zellerträge. Da innerhalb der drei Sojaprodukte fettarmes Sojamehl auch in allen Einzelansätzen etwas höhere Zellausbeuten erbrachte als vollfettes Sojamehl, wurde für weitere Fermentationen fettarmes Sojamehl als N-Quelle benutzt.

Tab.5: Anzucht von 60A in verschiedenen N-Quellen (für HA5 ergaben sich prinzipiell gleiche Ergebnisse).
Medium: 2% N-Quelle, 0,5% Stärke; 0,2% Hefeautolysat; 0,1% K_2HPO_4; 0,1% Spurenelementelösung.

N-Quelle	Zellzahl/ml	Sporen/ml	Beobachtungen im Mikroskop nach 24 h
Sojamehl	$2,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	Zellen mit Spore und Kristall
Soja fettarm	$2,5 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	dito
Sojamin	$2,1 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$	dito
Fleischmehl	$2,0 \times 10^9$	$1,7 \times 10^9$	dito
Rapsschrot	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	dito
Distillers sol.	$5,8 \times 10^8$	$4,9 \times 10^8$	dito
Hafermehl	$2,2 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	dito
Maisquellwasser	$< 2 \times 10^7$	-	nur vegetative Zellen

1.5. Ersatz von Hefeautolysat durch Backhefe

Zu Beginn der Medienentwicklung war festgestellt worden, daß geringe Mengen Hefeextrakt bzw. Hefeautolysat einen positiven Einfluß auf Zellausbeute bzw. Kristallausbeute haben. SALAMA et al. (1983) berichten, daß für B.t. var. entomocidus ein Medium, bestehend aus nur 2% Futterhefe, gute Ergebnisse liefert. Aus diesem Grund wurde versucht, ob Backhefe Hefeautolysat ersetzen kann. 0,5% - 1% Backhefe brachten etwa ähnliche Zellerträge wie 0,2% Hefeautolysat. Eine weitere Erhöhung der Backhefekonzentration führte jedoch zu keiner Steigerung der Zellzahl. Backhefe ist eine billigere Hefequelle als Hefeautolysat, muß aber zuerst mit Schwefelsäure aufgeschlossen werden und im Anschluß mit Natronlauge neutralisiert werden. Aus diesem Grund wurde Hefeautolysat beibehalten. Fermentationen bis zum 200-l-Maßstab mit 0,5% Backhefe brachten aber vergleichbare Ergebnisse wie mit 0,2% Hefeautolysat.

1.6. Erste Fermentationen im komplexen Medium (SHS-Medium) im 10-l-Blattrührfermenter

Die ersten Fermentationen im entwickelten Komplexmedium wurden in 10-l-Fermentern durchgeführt, die nicht in situ sterilisierbar sind (Typ: New Brunswick). In diesen Fermentern kam es mit 2% Sojamehl meist zu Sterilitätsproblemen. Deshalb wurde die Sojakonzentration zunächst auf 1% gesenkt. Dabei waren unter den gegebenen Fermentationsbedingungen die Zellerträge gegenüber späteren Fermentationen mit 2% Soja nur wenig geringer . Ein Großteil weiterer Fermentationen wurde deshalb mit 1% Sojamehl durchgeführt.
Damit stand ein Medium mit 1% fettarmem Sojamehl, 0,5% Stärke, 0,2% Hefeautolysat, 0,1% K_2HPO_4 und 0,1% Spurenelementlösung als Fermentationsmedium zur Verfügung, das im Fermenter Zellausbeuten liefert, die im Bereich von HGP-Medium liegen, jedoch nicht höher (ungefähr 2×10^9 Zellen/ml).

2. Variation von Fermentationsparametern

2.1. Belüftung und Sauerstoffeintrag

Sauerstoff ist wegen seiner geringen Löslichkeit oft der limitierende Faktor in einer Fermentation mit aeroben Organismen. Dem Transport des Sauerstoffs durch die Kulturflüssigkeit in die Zelle kommt dabei eine wichtige Rolle zu. Neben einer ausreichenden Belüftung, ist deshalb vor allem auf eine gute Durchmischung des Mediums zu achten. Bei zu hohen Umdrehungszahlen des Rührwerks kann es aber zur Schädigung des Organismus kommen.
Für Bacillus ist eine optimale Sauerstoffversorgung nicht nur während des Wachstums, sondern vor allem während der Sporulation von entscheidender Bedeutung. Der Sporulations-

prozeß ist ein stark sauerstoffzehrender Vorgang(GOLLAKOTA und HALLVERSON, 1961), so daß eine optimale Sauerstoffversorgung zumindest Einfluß auf die Fermentationsdauer hat.

Unterschiedliche Belüftungsraten und Umdrehungszahlen wurden im 10-l-Blattrührfermenter und im 25-l-Umwurffermenter getestet. Im Blattrührfermenter wurden zwischen 200 rpm/ 0,3 vvm und 400 rpm/ 1,0 vvm, im Umwurfsystem von 800 rpm/ 0,3 vvm bis 1200 rpm/ 0,5 vvm einige Kombinationen getestet.

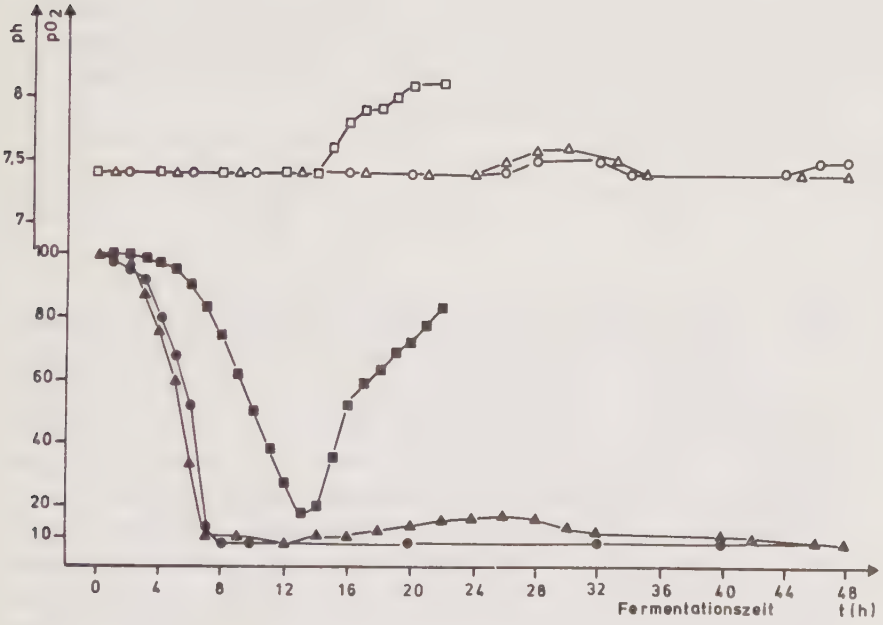


Abb.15: pO_2-Verlauf (geschlossene Symbole) und pH-Verlauf (offene Symbole) einer HA9-Fermentation bei verschiedenen Belüftungsraten und Drehzahlen.
●-● 800 rpm und 0,3 vvm; ▲-▲ 800 rpm und 0,5 vvm;
■-■ 1200 rpm und 0,5 vvm.

Im Blattrührfermenter war der Prozeß bei 200 rpm und 0,5 vvm noch sauerstofflimitiert. Bei 300 rpm und 0,5 vvm war die Sauerstofflimitierung überwunden. Eine weitere Erhöhung der Belüftungsrate und der Drehzahl brachte weder eine Steigerung der Zellzahl, noch eine Verkürzung der Fermentationsdauer. Beim Umwurfsystem war bei 800 rpm grundsätzlich die Sauerstoffversorgung noch ungenügend; bei 1200 rpm wurden beste Zellerträge und kürzeste Fermentationszeiten erreicht (Abb.15). Mit 1200 rpm und 0,5 vvm wurde in SHS-Medium mit 2% Soja mit 3 x 10^9 Zellen/ml die höchste Zellausbeute aller Fermentationen erreicht.
Der Wachstumsverlauf wird bei geringer Sauerstoffversorgung nicht beeinflußt. Es kommt aber zu einer etwas geringeren Zellausbeute (Abb.16). Dagegen wird die Sporulation deutlich beeinflußt (Abb.15). Nach 48 Stunden bei 800 rpm konnten nur vereinzelt Kristalle entdeckt werden.

2.2. pH-Verlauf

Der pH-Verlauf in Soja-Stärke-Medium, wie auch in HGP-Medium, zeigt eine charakteristische Kurve. Durch die Katabolisierung der C-Quelle kommt es zur Anhäufung von organischen Säuren im Medium, was einen deutlichen pH-Abfall in den ersten Stunden der Fermentation mit sich führt. Der pH sinkt dabei von anfänglich 7,4 auf ungefähr 5,4 - 4,8. Nach Abbau der Stärke bzw. der Glucose durch Metabolisierung der C6-Körper in der Glykolyse werden die organischen Säuren weiter metabolisiert. Zusätzlich kommt es durch verstärkte proteolytische Tätigkeit der Zellen zu einer Zunahme von freien Ammoniumionen (Ergebnisse nicht dargestellt). Bedingt durch diese physiologischen Ereignisse steigt der pH wieder an und erreicht am Ende der Fermentation Werte über 8,0.

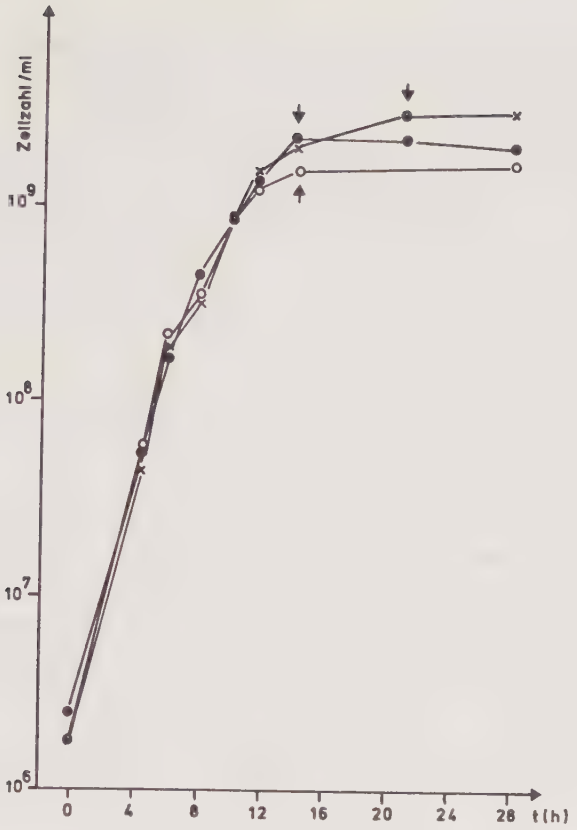


Abb.16: Wachstumsverlauf von HA9 in SHS-Medium (hier mit 2% Soja) im Umwurffermenter bei verschiedenem Sauerstoffeintrag. o-o 800 rpm und 0,3 vvm; ●-● 800 rpm und 0,5 vvm; x-x 1200 rpm und 0,5 vvm.

Im Idealfall bildet der pH-Verlauf eine V-förmige Kurve, d.h. nach Erreichen des niedersten pH-Wertes steigt die pH-Kurve sofort wieder an . In fast allen Fermentationen in komplexen Fermentationsmedien gab es aber einen U-förmigen pH-Verlauf. Der pH-Wert bleibt über eine bestimmte Zeit auf

dem Minimum. Dieser Effekt hat einen Einfluß auf die Dauer der Fermentation. Dabei läßt sich die Zeit ,in welcher der pH unter 5,5 liegt, etwa mit der verlängerten Fermentationszeit korrelieren. Die Dauer einzelner Fermentationen, die unter gleichen Bedingungen abliefen, variierte deshalb sehr stark.

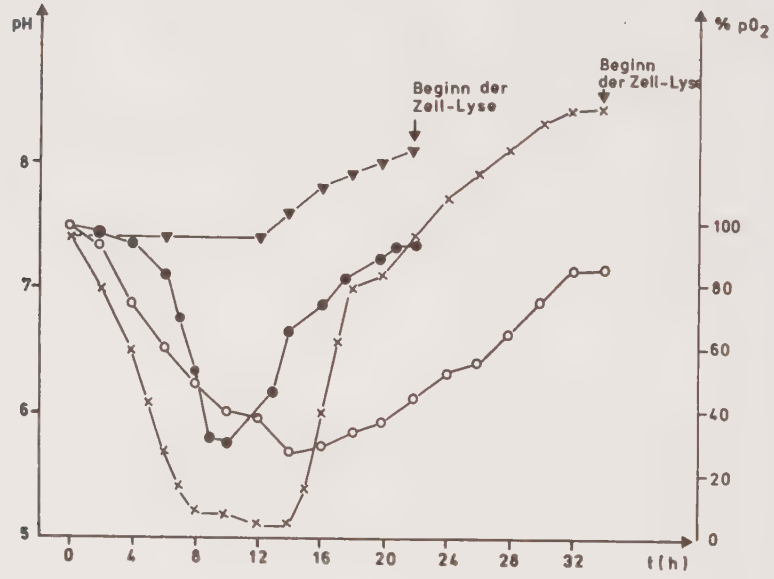


Abb.17: pH- und pO_2-Verlauf einer HA9-Fermentation in SHS-Medium; nicht pH-reguliert (x-x pH; o-o pO_2) und pH-reguliert (▼-▼ pH; ●-● pO_2).

Durch Abpuffern der Säuren wurde deshalb im folgenden der pH in der Wachstumsphase konstant gehalten, um dadurch den Fermentationsprozeß zu verkürzen und zeitlich zu stabilisieren. Die semi-pH-statische Fermentation mit 3N NaOH drükkte die Fermentationszeit in SHS-Medium auf 21 -24 Stunden.

Die Zeitangaben beziehen sich auf den Lysebeginn der Zellen. Die Lyse der gesamten Kultur kann sich über einige Stunden hinwegziehen. Abb.17 zeigt den ph- und pO_2-Verlauf einer pH-statisch und einer nicht pH-regulierten Fermentation mit dem Stamm HA9 in SHS-Medium. Die Zeitverkürzung beträgt hier 12 Stunden. Meist war die Verlängerung der Fermentationszeit bei nicht pH-statischer Prozeßführung allerdings nur 4 - 8 Stunden. Wird die gesamte Fermentation unter pH-statischen Bedingungen durchgeführt, ergibt sich kein weiterer Vorteil hinsichtlich der Fermentationsdauer. Daher wurde nur die Anfangsphase pH-statisch gesteuert. Eine pH-statische Prozeßführung hatte keinen Einfluß auf die Zellausbeute.

2.3. Alter der Vorkultur und Animpfdichte

Mit 12 - 14 Stunden alten Vorkulturen, die von 24 - 48 Stunden alten Platten angeimpft worden waren und 2,5% Animpfdichte ergaben sich gute Anwachsbedingungen. Mit höheren Animpfmengen konnte weder eine nachweisliche Verkürzung der Fermentationszeit, noch eine Erhöhung der Zellzahl festgestellt werden. Die Animpfdichte im Fermenter unter den oben genannten Bedingungen lag bei etwa $2x10^7$ Zellen/ml.

Vorkulturen, die älter als 16 Stunden sind und ihrerseits von frisch beimpften Agarplatten angeimpft worden sind, benötigen eine lange lag-Phase zur Adaptation im Fermenter, die sich über mehrere Stunden hinziehen kann. Die Zellen der Vorkultur befinden sich hier schon am Ende der Wachstumsphase. Bacillus Zellen, die schon in der stationären Phase sind, sind normalerweise sporulationskompetent und damit für den Fermentationsprozeß endgültig verloren.

3. Fermentation von HA9

Die Fermentationen der Stämme 60A, HA5 und HA9 in Komplexmedien lieferten unter gleichen Bedingungen, abgesehen von stammspezifischen Unterschieden, den prinzipiell gleichen Fermentationsverlauf. Die folgenden Ausführungen beschränken sich deshalb auf den Stamm HA9. Die hier aufgeführten Fermentationen wurden alle in SHS-Medium mit 1% Soja durchgeführt.

3.1. Fermentation im Labormaßstab

Alle Fermentationen wurden im batch-Verfahren durchgeführt: zur Optimierung der Medien im Schüttelkolben; zur Variation der Fermentationsbedingungen,zur Fermentationsanalyse und zur Produktgewinnung im 10-l-Blattrührfermenter oder im 20-l- bzw. 25-l-Umwurffermenter. Dabei ergaben sich unter optimalen Bedingungen (300 rpm/ 0,5 vvm bzw. 1200 rpm/ 0,5 vvm) keine Unterschiede zwischen Blattrührsystem und Umwurfsystem.

Den Ablauf einer Fermentation im 25-l-Umwurfreaktor zeigt die Abbildung 18. Angeimpft wurde mit 500 ml einer 14 Stunden alten Vorkultur, d.h. mit nur 2% Animpfmenge. Die Zellen der Vorkultur befanden sich noch in exponentiellem Wachstum; die Zellen im Reaktor wuchsen ohne lag-Phase sofort exponentiell weiter. Nach 12-stündiger Wachstumsphase traten die Zellen in die stationäre Phase ein. Das Auftreten erster Sporulationsanzeichen ließ sich im Phasenkontrastmikroskop in der vierzehnten Fermentationsstunde erkennen. Erste Zellyse ereignete sich ungefähr nach 20 - 21 Stunden. Um ein Wiederhochwachsen der Zellen zu vermeiden, wurde kurz vor Lyse der Zellen die Temperatur auf 43^{o}C erhöht.
Abbildung 19 zeigt die Abnahme der Lebendkeimzahl bei HA9 nach Temperaturerhöhung (hier bei einer nicht pH-gesteuerten Fermentation). Innerhalb von 4 Stunden ist die Anzahl

lebensfähiger vegetativer Zellen auf Null gesunken. Man hat im Fermenter sterile Verhältnisse.
Der Fermentationsverlauf im 10-l-Blattrührfermenter bei 300 rpm und 0,5 vvm entspricht dem Fermentationsverlauf im Umwurffermenter bei 1200 rpm und 0,5 vvm.

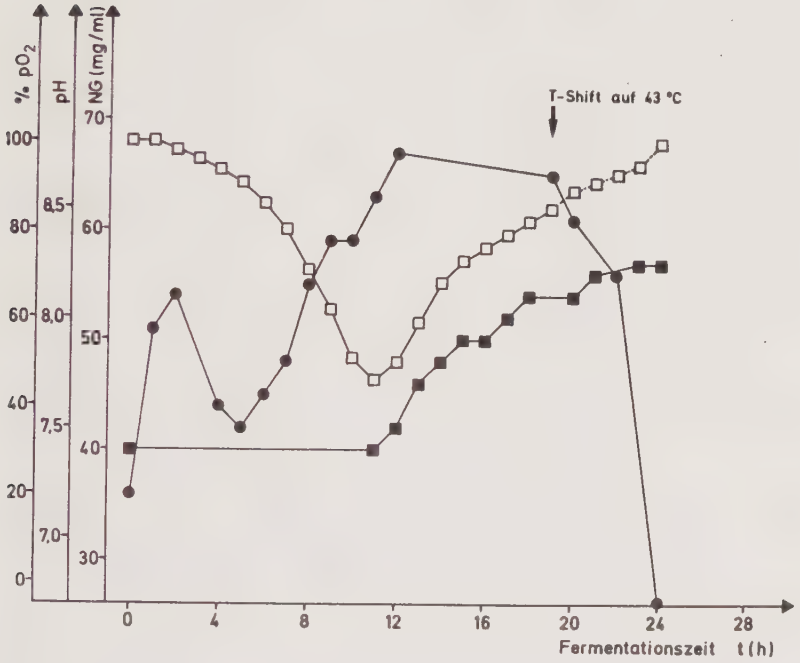


Abb.18: batch-Fermentation von HA9 im 25-l-Umwurffermenter (SHS-Medium, 1200 rpm, 0,5 vvm, 28°C);
●-● Naßgewicht; □-□ pO_2; ■-■ pH.

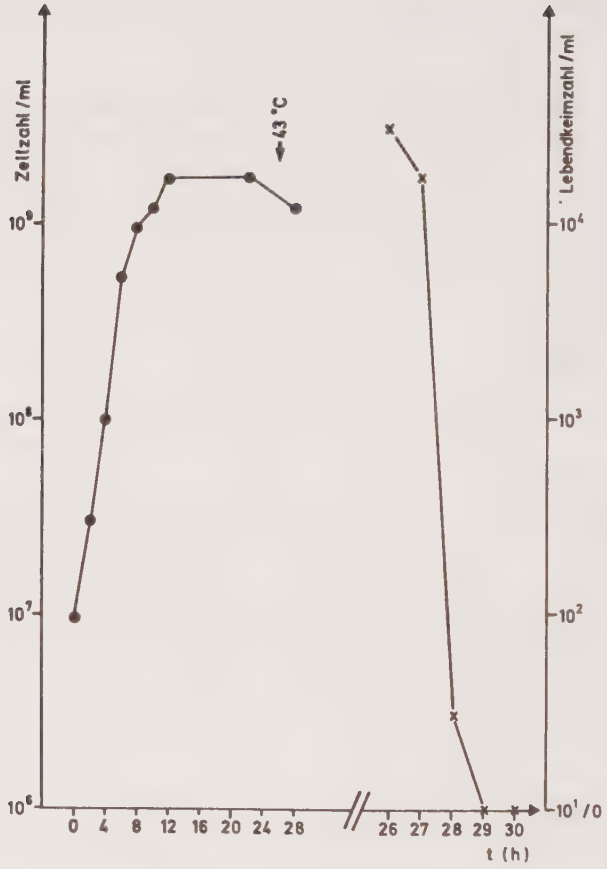


Abb.19: Abnahme der Lebendkeimzahl im Anschluß an eine Temperaturerhöhung von 28°C auf 43°C am Ende einer HA9-Fermentation im 10-l-Blattrührfermenter.
Die Gesamtzellzahl (●-●) wurde in der Bakterienzählkammer ermittelt, die Lebendkeimzahl (x-x) (Anzahl nichtsporulierter lebensfähiger Zellen) wurde durch Ausplattieren bestimmt.

Ungefähr parallel zur Wachstumskurve verläuft die Kurve der Biomasse, die anfänglich diskontinuierlich verläuft. Nach Anstieg des Naßgewichts in den ersten 2 - 3 Stunden erfolgt

ein mehr oder weniger starker Einschnitt, der im Falle der hier gezeigten Fermentation besonders stark ausgeprägt ist. Die Abnahme der Substratmasse ist in dieser Phase größer als die Zunahme der Zellmasse. In der mittleren und späteren Wachstumsphase überwiegt dann die Zunahme der Zellmasse wieder die Abnahme der Substratmasse, bis zum Erreichen der stationären Phase. Während der Sporulation stoppt die Zunahme des Zellwachstums; für die Synthese der Kristalle und Präsporen werden aber weiter Proteine als Zellmaterial benötigt. Deshalb ist das Naßgewicht leicht rückgängig bis zu Beginn der Lyse der Zellen. Ab dann sinkt das Naßgewicht stark ab. Bei HA9 ist durch die zusätzliche Lyse verbliebener vegetativer Zellen nach Temperaturerhöhung der Abfall des Naßgewichts noch deutlicher als bei HA5 und 60A.

Der pH wurde während der Wachstumsphase bei 7,4 konstant gehalten. Zum Abpuffern der organischen Säuren werden im 25-l-Fermenter etwa 600 ml 3N NaOH benötigt. Dabei scheint es ohne Belang zu sein, ob NaOH grob oder fein dosiert zugegeben wird, die Organismen scheinen nicht sehr empfindlich gegenüber kurzfristigen pH-Schwankungen zu sein. Etwa mit Beginn der stationären Phase erfolgt eine Alkalisierung des Mediums über den anfänglichen pH-Wert hinaus. Der pH-Anstieg erfolgt kontinuierlich aber meist treppenartig. Der End-pH liegt unter den vorliegenden Bedingungen normalerweise zwischen 8,2 und 8,5.

Die pO_2-Kurve verläuft etwa gleichsinnig einer pH-Kurve im nicht pH-regulierten System. Bis zum Ende der Wachstumsphase erfolgt unter den vorliegenden Bedingungen ein steiler Abfall bis auf unter 50% des Anfangswertes; die Sauerstoffversorgung ist nicht limitiert. Gegen Ende der Wachstumsphase zeigt die Kultur stärkste metabolische Aktivität. Der Rückgang des Sauerstoffpartialdrucks während der Sporulation erfolgt langsamer, die Kurve ist etwas abgeflachter. Obwohl die Stoffwechselaktivität der Zellen während der Sporulation geringer ist, sind die Zellen in dieser Phase wesentlich

empfindlicher gegenüber Sauerstoffmangel als in der Wachstumsphase.

3.2. Fermentation im 200-l-Maßstab

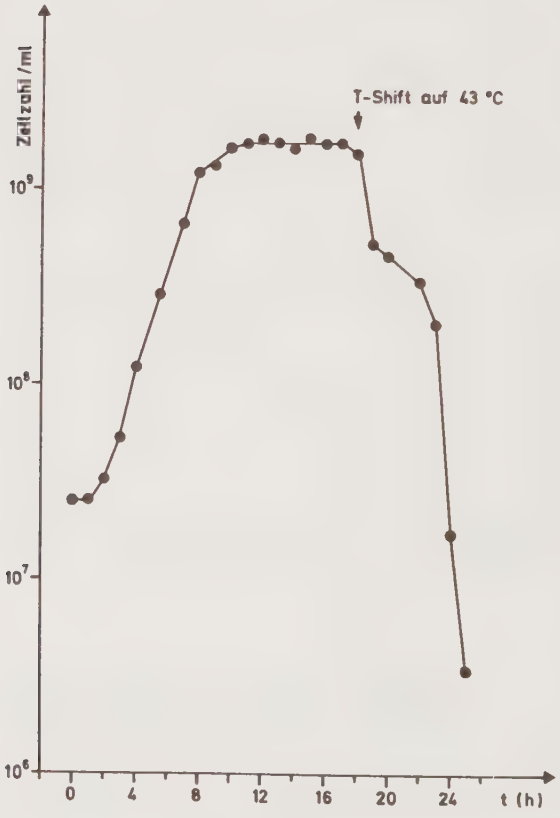


Abb.20a: Wachstumsverlauf einer HA9-Kultur im 200-l-Umwurffermenter bei 1200rpm, 0,5 vvm und 28°C.

Zur Entwicklung einer im technischen Maßstab zu produzierenden mikrobiologisch hergestellten Substanz, sollten bei der Übertragung des Produktionsverlaufs vom Labormaßstab zum technischen Maßstab keine Verluste auftreten. Um Fermentationserfolg und Fermentationsverlauf im halbtechnischen Maßstab beurteilen zu können, wurden Fermentationen im 200-l-Maßstab durchgeführt.

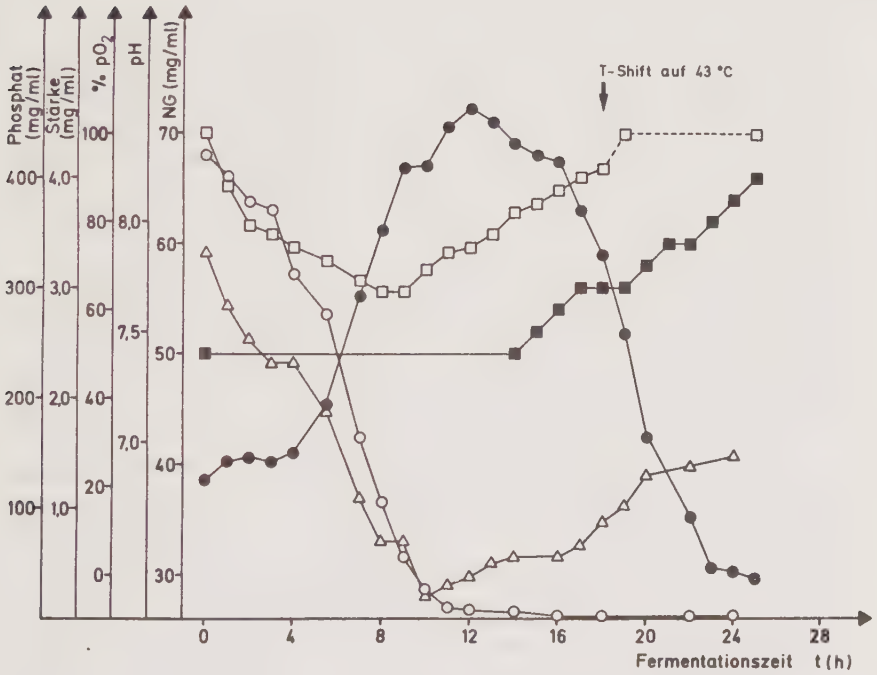


Abb.20b: HA9-Fermentation im 200-l-Umwurffermenter (SHS-Medium, 1200rpm, o,5 vvm); ●-● Naßgewicht, □-□ pO_2, ■-■ pH, o-o Stärke, △-△ Phosphat.

Beim scale-up auf 200-l Fermentervolumen konnten die Fermentationsbedingungen des 25-l-Fermenters übernommen werden. Gegenüber einer 25-l-Fermentation traten keine Veränderungen im Fermentationsablauf und Zellertrag ein (Abb. 2oa und 20b). Auch die Biotests lieferten übereinstimmende Ergebnisse (Tab.6). Angeimpft wurde der 200-l-Fermenter mit einer sechs Stunden alten Vorkultur, die in einem 20-l-Vorfermenter unter den in 3.1. genannten Bedingungen angezogen wurde.

3.3. Recycling - Fermentation

Bei der Lyse der Zellen am Ende der Sporulationsphase werden neben Kristallen auch Substrate freigesetzt. Diese freigesetzten Nährstoffe erlauben, daß Zellen, die während der stationären Phase des Kulturverlaufs in vegetativem Zustand verharren, mit Beginn der Zellyse wieder hochwachsen können. Nach Ernte der Kristalle bei einer HA9-Fermentation mit Temperaturerhöhung bleibt somit ein Kulturüberstand zurück, der noch eine Vielzahl von Nährstoffen enthält. Dieser flüssige Überstand wird normalerweise verworfen, das heißt ins Abwasser gegeben, und stellt aufgrund seiner vor allem organischen Nährstoffe und seines hohen Phosphatgehalts (Abb.20b) eine Belastung des Abwassers dar. Aus diesem Grund und zur weiteren Einsparung von Substraten wurde versucht, im Kulturüberstand erneut zu fermentieren. Da im Kulturüberstand keine Stärke mehr festzustellen war (Abb.20b) und angenommen werden kann, daß der größte Teil der N-Quelle für den Aufbau von Kristallen und Zellmembranen verbraucht war, wurde der Kulturüberstand wieder mit 1% fettarmem Sojamehl und 0,5% Stärke ergänzt. Hefeautolysat, K_2HPO_4 und Spurenelemente wurden nicht mehr zugesetzt. In diesem Medium wurde erneut fermentiert.

Im Schüttelkolben wurden in einem solchen Recyclingmedium gleiche Zellzahlen erreicht wie im Grundmedium. Daraufhin wurde eine Recycling-Fermentation auch im 25-l-Umwurffermen-

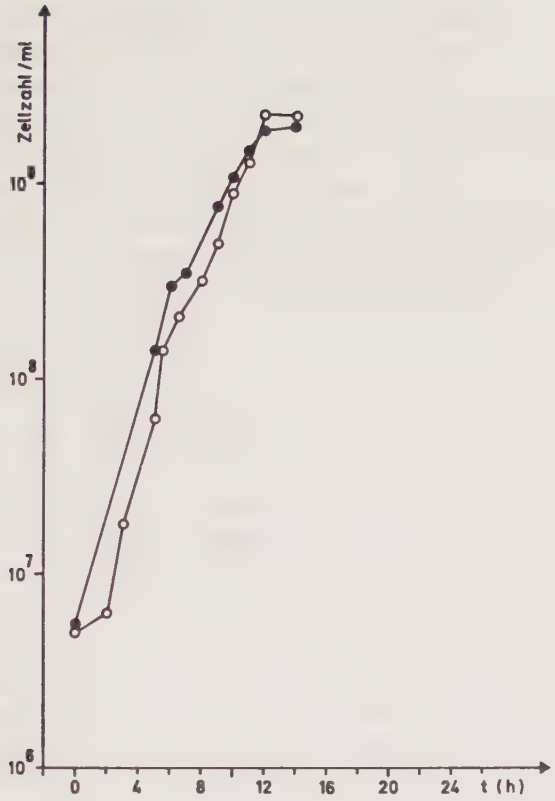


Abb.21: Vergleich des Wachstumsverlaufs einer HA9-Fermentation in SHS-Medium (o-o) und Recycling-Medium: Kulturüberstand + 1% Soja + 0,5% Stärke (●-●) im 25-l-Umwurffermenter.

ter durchgeführt. Die Resultate zeigten, daß eine Wiederverwertung des Mediums nach Ergänzung mit Soja und Stärke ohne Verluste möglich ist. Zellausbeute (Abb.21) und Fermentationsverlauf weichen nicht von der Grundfermentation ab. Die einzigen Unterschiede ergeben sich beim pH des Mediums. Am Ende einer Fermentation herrscht ein pH von über 8. Wird das Medium vor dem Sterilisieren auf pH 7,4 eingestellt, liegt

der pH-Wert nach dem Steilisationsvorgang aber erneut wieder bei etwa 8. Deshalb mußte der pH vor dem Animpfen mit 3N Schwefelsäure wieder eingestellt werden. Eine mehrmalige Verwendung des Mediums dürfte wahrscheinlich aufgrund des immer höher werdenden Salzgehaltes begrenzt sein. Im Schüttelkolben konnte das Medium dreimal wiederverwendet werden, ohne schlechtere Zellerträge zu bekommen. Die Aktivität der Präparation aus der Recycling-Fermentation war im Biotest etwa gleich gut wie aus der Grundfermentation.

4. Vergleich einiger Fermentationen im Biotest

Tab.6: LD_{50}-Werte einiger Fermentationsproben

Fermentationsprobe	LD_{50}
HA5 in SHS 200-l-Ferm.	23,0 ppb
HA5 in SHS 200-l-Ferm. (lyophilisiert)	3,5 ppb
HA9 in SHS 200-l-Ferm.	29,0 ppb
HA9 in SHS 200-l-Ferm. (lyophilisiert)	3,5 ppb
HA9 in SHS 25-l-Ferm.	10,0 ppb
HA9 in SHS 25-l-Ferm. (lyophilisiert)	3,2 ppb

Zur Beurteilung verschiedener Fermentationen wurden zum Teil größere Testreihen angelegt, um die Aktivität der erhaltenen Sedimente gegen Aedes-Larven zu beurteilen. Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse von 25-l- und 200-l-Fermentationen mit HA5 und HA9. Die Aktivitäten der Präparate ,die aus 25-l- oder 200-l-Fermentationen in SHS-Medium stammen, sind etwa gleich gut, wie solche aus 200-ml- oder 10-l-Fermentationen in HGP. Die Aktivität wird durch das scale-up kaum geringer. Die Werte, die in Tabelle 6, wie auch in Tabelle 7 dargestellt sind, wurden von Herrn Dr.Krieg, BASF, Limburgerhof, ermit-

telt. Ihm sei an dieser Stelle nochmals gedankt.

5. Stabilitätstests

Während einer industriellen delta-Endotoxin-Produktion und vor allem bis zum Zeitpunkt des Einsatzes, dürfen die Kristalle keinen Aktivitätsverlust erleiden. Wie jedes biologische Produkt unterliegen die delta-Endotoxin-Kristalle bei Raumtemperatur mikrobiologischem Befall und Abbau. Proteolytischer Abbau kann sich selbst bei 4°C über längere Zeit hin durch psychrophile Bakterien ereignen und bringt einen unerwünschten Aktivitätsabfall mit sich. Die Kristalle müssen deshalb vor Abbau geschützt werden.

Tab.7: Aktivität verschiedener Fermentationsansätze nach Lagerung bei Raumtemperatur.

	Stamm	Medium	Aktivität nach			
			0 Wo	1 Wo	2 Wo	3 Wo
1.	60A	SHS 1% Soja	100%	15%	6%	8%
2.	HA5	SHS 2% Soja	100%	92%	21%	17%
3.	HA5	HGP	100%	105%	41%	47%
4.	HA5	PG	100%	65%	96%	71%

Tabelle 7 zeigt, daß der Verlust der Kristallaktivität um so schneller eintritt, je nährstoffreicher das Fermentationsmedium war. Gleich anderen biologischen Produkten kann die abzentrifugierte Festmasse mit den Kristallen tiefgefroren werden und hält sich so über lange Zeit. Auch Gefriertrocknen bietet sich als geeignete Methode an. Konservierungen mit organischen Konservierungsmitteln wie Xylol

brachten von vornherein eine starke Abnahme der Aktivität; abgesehen davon, daß solche Mittel in biologischen Schädlingsbekämpfungsmitteln unerwünscht sind. Deshalb wurden die Sedimente über Einfrieren oder Lyophilisieren konserviert.

IV. D I S K U S S I O N

Zur Bekämpfung von Stechmückenlarven müssen delta-Endotoxin-haltige Präparate in Gewässer ausgebracht werden. Bei Präparaten, die mit dem Wildstamm von B.t.i. hergestellt werden, gelangen die delta-Endotoxin-Kristalle als Kristall-Sporen-Gemisch ins Wasser, da eine Isolierung der Kristalle technisch nicht möglich ist. Die Sporen verursachen einen Anstieg der Keimzahl im Gewässer und dürfen in der BRD nicht ausgebracht werden. Eine weitere Unzulänglichkeit solcher Präparate liegt in einer noch zu niederen Konzentration des eigentlichen Wirkstoffs im Präparat. Um diese Nachteile zu beseitigen, wurde versucht, eine Verbesserung der Präparate zu erreichen. Dies geschah einerseits über eine Fermentationsoptimierung und andererseits durch genetische Verbesserung des B.t.i.-Wildstamms 60A, auch hinsichtlich seiner Fermentationseigenschaften. Um möglichst bald Material zur Formulierung und Applikation von B.t.i.-Präparaten zur Verfügung stellen zu können, mußte relativ früh ein einigermaßen effizienter Fermentationsprozeß etabliert werden.

1. Stammverbesserung: Sporendefekte, kristallbildende Mutanten von B.t.i.

Eine effektive Methode, um zu keimfreien B.t.-Präparaten zu gelangen, ist der Weg über sporendefekte Mutanten, die noch fähig sind, uneingeschränkt Kristallsynthese zu betreiben. Ausgehend von diesem Ansatz wurde in dieser Arbeit eine sporendefekte Mutante isoliert, die letztlich nur noch Kristalle bildet. Für diese Mutante wurde zur Produktion von delta-Endotoxin-Kristallen ein Fermentationsprozeß ausgearbeitet. Das Fermentationsverhalten dieser Mutante HA5

machte eine Weiterentwicklung des Stamms notwendig. Um ein erneutes Hochwachsen nicht sporulierter und damit nicht kristallbildender Zellen gegen Fermentationsende zu vermeiden, wurde ausgehend von HA5 die temperatursensitive Mutante HA9 isoliert. Mit dieser Mutante konnte über eine Temperaturerhöhung am Ende einer Submersfermentation ein keimfreies, hochkonzentriertes und damit sehr aktives Ausgangspräparat von B.t.i.-Kristallen hergestellt werden.

Für die länger bekannten B.t.-Stämme der Pathotyp A-Gruppe, die gegen Schmetterlingslarven toxisch sind, wurden solche cry^+,spo^--Mutanten schon vor über zehn Jahren beschrieben (NISHIITSUTSJI-UWO et al. , 1975; NISHIMURA und NISHIITSUTSUJI-UWO, 1980; WAKISAKA et al., 1982). 1982, fünf Jahre nach Entdeckung von B.t.i., beschrieben CHARLES und DE BARJAC zum ersten Mal eine sporendefekte, kristallbildende Mutante von B.t.i. und 1986 berichtete YOUSTEN von oligosporogenen, kristallbildenden Mutanten von B.t.i.. 1983 wurde in unserem Labor ebenfalls eine sporendefekte B.t.i.-Mutante (HA1) isoliert, mit dem konkreten Ziel, ein keimarmes Präparat zu gewinnen (WEISSER, 1983).

Der Stamm HA1 hat aber noch den Nachteil, daß die Sporulation in einem späten Stadium blockiert ist. Dadurch werden noch defekte Sporen mit den Kristallen freigesetzt, denn die Präsporen sind in diesem Stadium gegen lytische Enzyme nicht mehr empfindlich (TIPPER und GAUTHIER, 1972). HA1 bildet noch alle Sporenschichten aus; der Cortex scheint nicht mehr in der Lage zu sein, durch entsprechende Kontraktion die Dehydrierung des Sporenprotoplasten zu erreichen und aufrecht zu erhalten. Die Präsporen sind noch stoffwechselaktiv und nicht hitzeresistent. Der Stamm HA1 dürfte ungefähr einer der drei sporendefekten Mutanten entsprechen, die von YOUSTEN (1986) beschrieben wurden. Die beiden andern von ihm beschriebenen Mutanten bilden gleichfalls noch alle Sporenschichten aus, weisen aber einen unregelmäßig gestalteten Cortex auf, dessen Breite innerhalb einer Präspore

stark variiert.

Um eine $cry^{+}spo^{-}$-Mutante zu gewinnen, die in einem möglichst frühen Stadium der Sporulation blockiert ist, wurde der Wildstamm 60A mit NTG mutagenisiert. Die hierbei gewonnene Mutante HA5 bricht die Sporulation in einem frühen Stadium ab und entläßt nach Lyse der Kultur nur Kristalle. Die noch gebildete Präspore lysiert wie die Sporenmutterzelle.

Die Mutante BN8-15, die von CHARLES und DE BARJAC 1982 beschrieben wurde, ist in einem ähnlichen Stadium blockiert wie die Mutante HA5, wahrscheinlich etwas später. BN8-15 wurde durch Mutagenese mit EMS (Ethyl-methan-sulfonat) gewonnen. Wie HA5 ist diese Mutante im Übergang von Stadium III zu Stadium IV blockiert, verhält sich aber im weiteren Verlauf der Sporulation anders. Ab dem Zeitpunkt des Stillstands des normalen Sporulationsgeschehens ändert sich diese Präspore in ihrem Aussehen nicht mehr bis die Lyse der Kultur einsetzt. Die Lyse der Präsporen von BN8-15 erfolgt vor der Lyse der Mutterzellen. Die Präspore entleert sich und läßt eine leere Hülle zurück, wahrscheinlich ein fertiges Exosporium, dessen Synthese damit noch fortgesetzt worden sein muß.

Bei HA5 und der morphologisch nicht unterscheidbaren Mutante HA9 kommt es vor Lyse des Sporangiums zum Zusammenbruch der Präsporenmembranen und damit zur Auflösung des Präsporenprotoplasten. Das Exosporium wird nicht fertig ausgebildet. Es finden sich nach Lyse der Sporangien keine Anzeichen mehr von einer Präspore. Diese Auflösung der Präspore läßt sich im Lichtmikroskop beobachten. Nachdem am Anfang der Sporulationsphase kurz nach dem Auftreten des Kristalls die Präspore im Sporangium sichtbar wird, und die Zelle dann über längere Zeit in diesem Zustand verharrt, verschwindet die Präspore wieder ein bis zwei Stunden bevor die Mutterzelle lysiert.

Die Entwicklung und der Aufbau der parasporalen Kristalle bei HA5 ist nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Die Kristalle bestehen aus mehreren Segmenten verschiedener Form, Größe und elektronenoptischer Dichte, wobei letzteres auf verschiedene Kristallisationswinkel zurückzuführen sein könnte, d.h. die Winkel im Gitter sind in der Schnittebene verschieden. Die Kristalle sind von einer Hülle umgeben, die möglicherweise aus Ribosomen besteht (RIBIER und LECADET, 1973).

Beim Vergleich der parasporalen Kristalle von HA5 mit 60A im SDS-Polyacrylamid-Gel fiel auf, daß der sporendefekten Mutante eine Hauptproteinbande fehlt. 60A weist vier Hauptproteinbanden auf: bei etwa 120 kD, 70 kD, 35-40 kD und 25-28 kD. Die Bande bei 35-40 kD fehlt HA5. Diese fehlende Proteinbande kann als weiterer Beweis dafür gewertet werden, daß die Proteine bei 35-40 kD nicht aus dem Kristall stammen. Mittlerweile wurde in unserem Labor von BERNHARD et al. (1986) festgestellt, daß es sich bei diesen Proteinen um spore-coat-Proteine handelt, die deshalb bei der sporulationsdefekten Mutante HA5 nicht existieren können, weil dieser Stamm nicht in der Lage ist, typische Sporenhüllen wie spore-coat zu bilden. Alle oben genannten Kriterien bezüglich Sporulation und Kristallbau gelten für HA9 in gleicher Weise wie für HA5.

Die Mutante HA5 bietet gegenüber dem Wildtyp 60A aber auch der Mutante HA1 zwei Vorteile:

1) Durch den frühen Block in der Sporulation wird eine Präspore gebildet, die wahrscheinlich nur von zwei Zellmembranen umgeben ist: der inneren und äußeren Präsporenmembran . Dadurch ist die Präspore von HA5 gegenüber lytischen Enzymen empfindlich und wird am Ende der Sporulation ebenso wie die Sporenmutterzelle durch autolytische Enzyme aufgelöst. Dabei wird die Präspore noch früher als das Sporangium lysiert. Durch diesen Vorgang bleiben am Ende eines Kulturzyklus keine Präsporen mehr im Medium, wie bei

HA1. Es werden nur Kristalle freigesetzt. Man erhält ein relativ steriles Präparat, in welchem höchstens noch einige vegetative Zellen sind.
2) Infolge der fehlenden Sporen bzw. Präsporen finden sich im Kultursediment fast nur noch Kristalle und Membranfragmente. Dies hat eine höhere Konzentrierung der Kristalle zur Folge. Gleiche Mengen an Sediment haben eine höhere Aktivität als bei 60A oder HA1, die spezifische Aktivität ist höher.

Zur Gewinnung von sterilen und hochaktiven Präparaten wies der Stamm HA5 noch einen Nachteil auf, der für die Stämme HA1 und 60A in gleicher Weise zutrifft. Bei einer Fermentation in komplexen Medien, wie SHS-Medium, kommt es nach Lyse der Sporenmutterzellen zu kryptischem Wachstum. Wie erwähnt, verbleibt im Komplexmedium ein gewisser Anteil an Zellen während der Sporulation in vegetativem Zustand. Im Zuge der Cytolyse werden wieder Substrate freigesetzt, wodurch die ruhenden vegetativen Zellen erneut hochwachsen können. Wird der Fermentationsprozeß nicht rechtzeitig abgebrochen, führt der erneute Anstieg vegetativer Zellen zu einer zunehmenden Verdünnung der Kristalle im Zellsediment.

Zur Vermeidung dieses unerwünschten Nebeneffekts wurde versucht, ausgehend vom Stamm HA5, eine Mutante zu gewinnen, die eine ts-Mutation in einem vegetativen Gen aufweist. Die Mutation sollte dem neuen Stamm normales Wachstum bei 28°C ermöglichen, bei einer höheren Temperatur sollte aber kein Wachstum mehr möglich sein. Mit HA9 wurde nach NTG-Mutagenese eine solche Mutante isoliert, die sich als Lethalmutante erwies. Lethale ts-Mutanten sind solche Mutanten, die bei nicht-permessiver Temperatur nicht nur mit dem Wachstum aufhören, sondern bei dieser Temperatur irreversibel geschädigt werden (KOHIYAMA et al., 1966). Allerdings stellt die Mutante HA9 damit nach einer Temperaturerhöhung auch sofort die Kristallsynthese ein. Mit dem Stamm HA9 kann durch eine Temperaturerhöhung am Ende der Fermentation, d.h.

vor Einsetzen der Zellyse, ein weiteres Heraufwachsen nichtsporulierter vegetativer Zellen verhindert werden, bzw. die vorhandenen vegetativen Zellen können abgetötet und lysiert werden. Die Fermentation kann dann abgebrochen werden, wenn alle Sporangien lysiert sind. Dies ist gewöhnlich etwa zwei bis sechs Stunden nach Lysebeginn der Fall. Bei Fermentationen mit HA9 im 25-l-Fermenter ist drei Stunden nach Temperaturerhöhung keine lebensfähige Zelle mehr vorhanden.

Während bei einer gut verlaufenen HA5-Fermentation bis zum 200-l-Maßstab die Synchronisation der Zellstadien trotz des komplexen Mediums noch einigermaßen gut sein kann und über mikroskopische Kontrolle der Fermentationsprozeß noch rechtzeitig abgebrochen werden kann, muß beim weiteren scale-up damit gerechnet werden, daß die Zellstadien immer desynchronisierter werden. Damit alle "sporulierten" Zellen ihren Kristall voll ausbilden können, muß man in Kauf nehmen, daß wieder vegetative Zellen hochwachsen. Durch die anschließende Temperaturerhöhung werden bei HA9 die vegetativen Zellen wieder abgetötet und lysiert. Man erhält ein steriles Präparat und die Verdünnung des Pellets wird wieder rückgängig gemacht.

Das wesentliche Kriterium einer Stammverbesserung und Fermentationsoptimierung bei B.t.i. ist eine Steigerung der Aktivität der Kristallpräparationen. Da Biotests mit Insektenlarven aufwendig sind, mußten solche Tests auf einen Vergleich der Mutanten mit dem Wildtyp und auf einige Fermentationen beschränkt werden. Die Aktivität der sporendefekten Mutanten HA5 und HA9 liegt infolge der fehlenden Spore bzw. Präspore erwartungsgemäß höher als beim Wildtyp 60A. Der Unterschied beträgt fast eine Zehnerpotenz. Versuche, die im Tropenmedizinischen Institut der Universität Tübingen an Aedes ägypti mit einem HA5-Präparat durchgeführt wurden und zu einer LC_{50} von 15,5 ppb führten, bestätigten die eigenen Ergebnisse (pers. Mitteilung RUTSCHKE). Bei Freilandversuchen in der Oberrheinischen Tiefebene wurden Präparate der

sporendefekten Mutanten HA5 und HA9 schon erfolgreich eingesetzt (pers. Mitteilung W.KRIEG).

2. Fermentation der sporendefekten Mutanten

Der Fermentationsprozeß wurde zunächst für den Stamm HA5 erarbeitet, konnte aber später uneingeschränkt für HA9 übernommen werden. Eine wesentliche Forderung für eine industrielle B.t.i.-Fermentation ist ein kostengünstiger Fermentationsprozeß. Dazu gehört neben optimalen Fermentationsbedingungen ein geeignetes Medium. HGP-Medium, welches üblicherweise im Labor als Vollmedium benützt wird, ist aus wirtschaftlichen Gründen für eine großtechnische Fermentation nicht zu vertreten, denn Caseinpepton und Hefeextrakt sind zu teure Nährstoffe. Aus diesem Grund wurde nach einem Fermentationsmedium gesucht, das aus möglichst billigen Rohstoffen zusammengesetzt ist, aber gute Wachstums- und Produktionsbedingungen liefert. Als Maß für den Fermentationserfolg wurde die Fermentationsdauer und als wichtigste Größe der Zelltiter genommen. Dabei war allerdings zu beachten, daß vor allem in komplexen Medien nicht jede Zelle sporuliert und damit einen Kristall bildet. Die Anzahl der Kristalle ist aber der wichtigste Faktor. Kristalle lassen sich jedoch in der Bakterienzählkammer schlecht auszählen. Viele Medienversuche wurden deshalb zuerst mit dem sporogenen Wildtyp 60A durchgeführt, um auch die Sporen auszählen zu können. Da dieser Stamm intakte Sporen bildet und auf jedes Kristall eine Spore kommt, ist die Anzahl der Sporen gleich der Anzahl der Kristalle. Sporen lassen sich in der Zählkammer aber wesentlich besser auszählen. Allerdings ist das Ausmaß der Sporulation und damit der Kristallbildung, mehr als der Zellertrag, abhängig von der Belüftung. Die Belüftung läßt sich aber im Schüttelkolben selbst bei gleicher Kolbengeometrie nicht exakt reproduzieren. Deshalb

waren die Sporenwerte bei gleichen Medienansätzen oft recht verschieden und mußten kritisch gesehen werden. Bei durchschnittlicher Betrachtung war aber die Anzahl nichtsporulierter Zellen in den meisten Medien etwa gleich und lag bei ungefähr 10% aller Zellen.

Die erste Optimierung mit der Methode der griechisch - lateinischen Quadrate erbrachte keine besseren Ergebnisse als HGP-Medium. Deshalb wurden im wesentlichen die Bestandteile des HGP-Mediums durch ähnliche aber billigere Nährstoffe (Hefeautolysat, Stärke und Sojamehl)ersetzt. Alle weiteren Optimierungsversuche zeigten kaum Verbesserungen.

B.t.i. verfügt wie die meisten Bacillus- thuringiensis-Stämme über Amylasen (KRIEG, 1981). Es konnte erwartet werden, daß Stärke gut verwertet werden kann. Die Metabolisierung der Stärke erfolgte genauso schnell wie die der Glucose. Stärke kann deshalb als C-Quelle eingesetzt werden. Als N-Quelle brachte fettarmes Sojamehl fast ebenso gute Ergebnisse wie Caseinpepton. DULMAGE berichtete 1971 über ein Medium für Stämme des Serotyps H-3, welches entfettetes Soja als einzige N-Quelle enthielt, nachdem er zuvor entfettetes Baumwollsamenmehl für die Anzucht lepidopterenaktiver B.t.-Stämme benutzt hatte (DULMAGE, 1970).
Ein wichtiger Medienbestandteil für gute Ausbeuten ist Hefeextrakt bzw. Hefeautolysat. Dabei scheint Hefeautolysat den hochwertigeren Hefeextrakt gleichwertig ersetzen zu können; lysierte B.t.i.-Zellen erfüllen den gleichen Zweck. Auch Bäckerhefe ist in der Lage, sofern die Hefezellen mit Säure aufgeschlossen werden, den Hefeextrakt zu ersetzen; es müssen jedoch höhere Konzentrationen eingesetzt werden. Das Aufschließen der Hefezellen ist aber aufwendig, und deswegen ist der Einsatz von Backhefe nicht lohnend. Die Bedeutung von Hefepräparaten für B.t.-Fermentationen wird bestätigt durch Ergebnisse die SALAMA et al. (1983) publizierten. Sie fanden auf der Suche nach billigen Fermentationsmedien für Bacillus thuringiensis Stämme der Varietäten entomocidus,

kurstaki und galleriae heraus, daß Medien mit Zusatz an Futterhefe beste Ergebnisse brachten, hinsichtlich Zellausbeute und Aktivität der Präparate. Mit einem Ein-Komponenten-Medium nur aus Futterhefe bestehend, die aus der Alkoholherstellung stammte, erreichten sie mit $5{,}8 \times 10^8$ Zellen/ml schon beachtliche Zellausbeuten. Auf welche Inhaltsstoffe der positive Einfluß von Hefepräparaten zurückgeht, ist unbekannt, es reichen aber schon relativ geringe Mengen.

Als wichtige Spurenelemente für Wachstum und Sporulation bei Bacillen gelten Mangan und Kalium. Bei Abwesenheit von Mangan kommt es zu einem frühzeitigen Wachstumsstop; Sporulation kann nicht stattfinden. Der Grund dafür liegt u.a. darin, daß die Phosphoglycerat-Phosphomutase manganabhängig ist (OH und FREESE, 1970). Eine Konzentration von 5 ug/ml scheint aber auszureichen, denn durch eine Steigerung der Konzentration der Spurenelemente und damit des Mangans konnte keine verbesserte Sporulation bzw. Kristallbildung beobachtet werden. Von Kalium wird ein positiver Einfluß auf die delta-Endotoxin-Produktion berichtet. WAKISAKA et al. (1982) erreichten mit 330 ug Kalium/ml Medium hohe Endotoxinausbeuten. Das hier verwendete Fermentationsmedium enthält 450 ug Kalium/ml, welches als K_2HPO_4 eingesetzt wurde, um gleichzeitig den Phosphatgehalt zu decken, der bei gram-positiven Bakterien wegen des Zellwandbaus vermehrt benötigt wird. Eine Steigerung des K_2HPO_4-Gehalts von 0,1% bis auf 0,5% zeigte keine sichtbare Verbesserung der Kristallausbeute, d.h. die Zellzahl blieb gleich und die Kristalle erschienen im Mikroskop nicht größer. Allerdings wurde, wie bei andern Medien auch, die Aktivität im Biotest nicht bestimmt. FODA et al. (1985) konnten jedoch durch Erhöhung des K_2HPO_4-Gehalts bei Bacillus thuringiensis-Varietäten eine verbesserte Kristallausbeute beobachten. ARCAS et al. (1984) schreiben Kalzium und Magnesium einen positiven Einfluß auf die Endotoxinausbeute zu, sind aber der Meinung, daß Hefeextrakt wahrscheinlich genügend dieser Spurenelemente enthält. Die in dieser Arbeit verwendete

Spurenelementelösung enthält ebenfalls einen hohen Anteil an Kalzium.

Ein wesentlicher Faktor für das Wachstum und vor allem für die Sporulation ist der Sauerstoffeintrag. GOLLAKOTA und HALVORSON (1961) berichten für Bacillus cereus einen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs mit Beginn der Sporulation. FODA et al.(1985) konnten bei Bacillus thuringiensis var. entomocidus feststellen, daß die Zellen bei schlechter Belüftung nicht sporulieren konnten. Diese Beobachtung wurde für B.t.i. auch gemacht. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen wurde das Wachstum nur leicht beeinträchtigt, die Sporulation wurde aber unterdrückt. Versuche im Temperaturgradienten konnten deshalb nicht durchgeführt werden. Wurden Schüttelkolbenkulturen zu irgendeinem Zeitpunkt der Sporulation von der Schüttelmaschine genommen und als Standkultur weiter inkubiert, arretierte die Kultur in dem Zustand den sie als letztes auf der Schüttelmaschine eingenommen hatte. Die sporendefekten Mutanten scheinen außerdem noch empfindlicher auf Sauerstoffmangel zu reagieren, wie aus dem Sporulationsverhalten bei verschiedenem Füllungszustand der Kolben zu schließen ist. Nimmt man allerdings die Sauerstoffpartialdruckkurve als Maß für die metabolische Tätigkeit der Kultur, so ist der höchste Sauerstoffverbrauch nicht zu Beginn der stationären Phase, sondern im letzten Drittel der Wachstumsphase.
Für eine Submersfermentation im Blattrühr- oder Umwurffermenter war es vor allem wichtig eine genügend hohe Drehzahl zu haben, um den vorhanden Sauerstoff im Kulturmedium optimal lösen zu können.

Der pH-Wert sinkt während der Fermentation zunächst stark ab, weil die C-Quelle nur zu organischen Säuren, vor allem zu Essigsäure abgebaut wird. Erst kurz vor Anfang der Sporulation wird das Acetat weitermetabolisiert. Da die Zellen bei niederem pH das Wachstum verlangsamen bzw. einstellen , wurde der pH während der Wachstumsphase der Fermentation

konstant gehalten. Dadurch wurde die Fermentationsdauer verkürzt und zeitlich stabilisiert.

Neben dem Medium und den physikalischen Fermentationsparametern, kommt dem physiologischen Zustand der Zellen in der Vorkultur für eine optimale Fermentation eine wichtige Bedeutung zu. Das Alter der Vorkultur, wie auch das Alter der Animpfkolonie auf der Agarplatte, stellen eine wichtige Größe im Fermentationsablauf dar. Dies gilt für einen schnell wachsenden Organismus wie Bacillus thuringiensis in besonderem Maße. Nur Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wachsen im Fermenter gut an; dies war bei etwa 14 Stunden alten Vorkulturen der Fall.

Unter den als optimal empfundenen Voraussetzungen, kann eine HA5 bzw. HA9-Fermentation in SHS-Medium bei Verwendung von 1% Soja in 24 Stunden mit etwa 2×10^9 Zellen/ml durchgeführt werden, bei Verwendung von 2% Soja in ungefähr 30 Stunden mit etwa 3×10^9 Zellen /ml. Die Fermentationsbedingungen von HA5 konnten später ohne Einschränkung auf HA9 übertragen werden.

Als eine Methode zur Einsparung von Substraten und zur geringeren Belastung der Abwässer, erwies sich ein Wiederverwenden von Kulturüberständen nach Lyse der Zellen. Die C-Quelle und N-Quelle sind weitgehend verbraucht und müssen wieder zugegeben werden, Hefe und die anorganischen Medienbestandteile müssen aber nicht mehr hinzugefügt werden. Die Ergebnisse, die mit solchen Recyclingfermentationen gemacht wurden, liegen kaum unter denen der Grundfermentation. SALAMA et al.(1983), die solche Versuche mit ihren Medien machten, kamen bei Wiederverwendung des Kulturüberstands nach Substitution nur mit Futterhefe sogar auf höhere Zelltiter als in ihrer Grundfermentation, lagen aber mit $1,5 \times 10^9$ Zellen /ml für B.t.e. in Futterhefemedium noch um die Hälfte niederer als die beste HA9-Fermentation mit 3×10^9 Zellen /ml.

Für die Produktion von lepidopterenaktiven B.t.-Stämmen wurden vor kurzem von FODA und SALAMA (1986) zwei neue Methoden zur preiswerten Fermentation vorgeschlagen. Zum einen eine Art Oberflächen-Fermentation mit halbfesten Medien, bei welcher die Bakterien auf aufgelegten, semipermeablen Zelluloseplättchen wachsen, was eine Ernte ohne Zentrifugation ermöglicht. Zum andern eine Fermentation in flüssigem Medium in flachen Schalen, wobei Verbindungen hinzugegeben werden, die ein hohes Redoxpotential aufweisen und in der Standkultur als Elektronenakkzeptoren dienen können. Mit beiden Methoden konnten die Autoren gute Ergebnisse erzielen.

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren mit der temperatursensitiven Mutante HA9 zur Herstellung keimfreier und hochaktiver Kristallpräparate verläuft nach folgendem Schema (Abb.22): Lyophilisierte oder in 30%-Glycerin bei -80°C konservierte HA9-Zellen werden auf HGP-Agar ausgebracht und etwa zwei Tage bei 27°C bebrütet. Von dieser Agarplatte wird als Fermentervorkultur HGP- oder SHS-Medium angeimpft und 14 Stunden bei 27°C auf der Schüttelmaschine inkubiert. Ein Vorfermenter wird mit 2,5% Vorkultur angeimpft und die Zellen sechs Stunden bei 28°C wachsen gelassen. Von dort erfolgt das scale-up mit 10% Animpfmenge zum Produktionsfermenter. Das Fermentationsmedium besteht aus 1% entfettetem Soja, 0,5% Kartoffelstärke, 0,2% Hefeautolysat, 0,1% K_2HPO_4 und 0,1% Spurenelementelösung. Fermentiert wird bei 28°C, mit 1200 rpm (Umwurffermenter), 0,5 vvm und einem während des Wachstums konstant gehaltenen pH von 7,4. Vor Lyse der Zellen, etwa nach 20 Stunden Fermentation wird die Temperatur auf 43°C erhöht, um ein erneutes Hochwachsen der restlichen vegetativen Zellen zu verhindern. Nach etwa weiteren 3 -4 Stunden kann die Fermentation beendet und die Kultur, die fast nur noch Kristalle enthält, über eine Durchlaufzentrifuge geerntet werden. Das Naßgewicht der Kristallernte beträgt rund vier kg pro 2oo-l-Fermenter. Die geernteten Kristalle werden tiefgefroren oder lyophilisiert

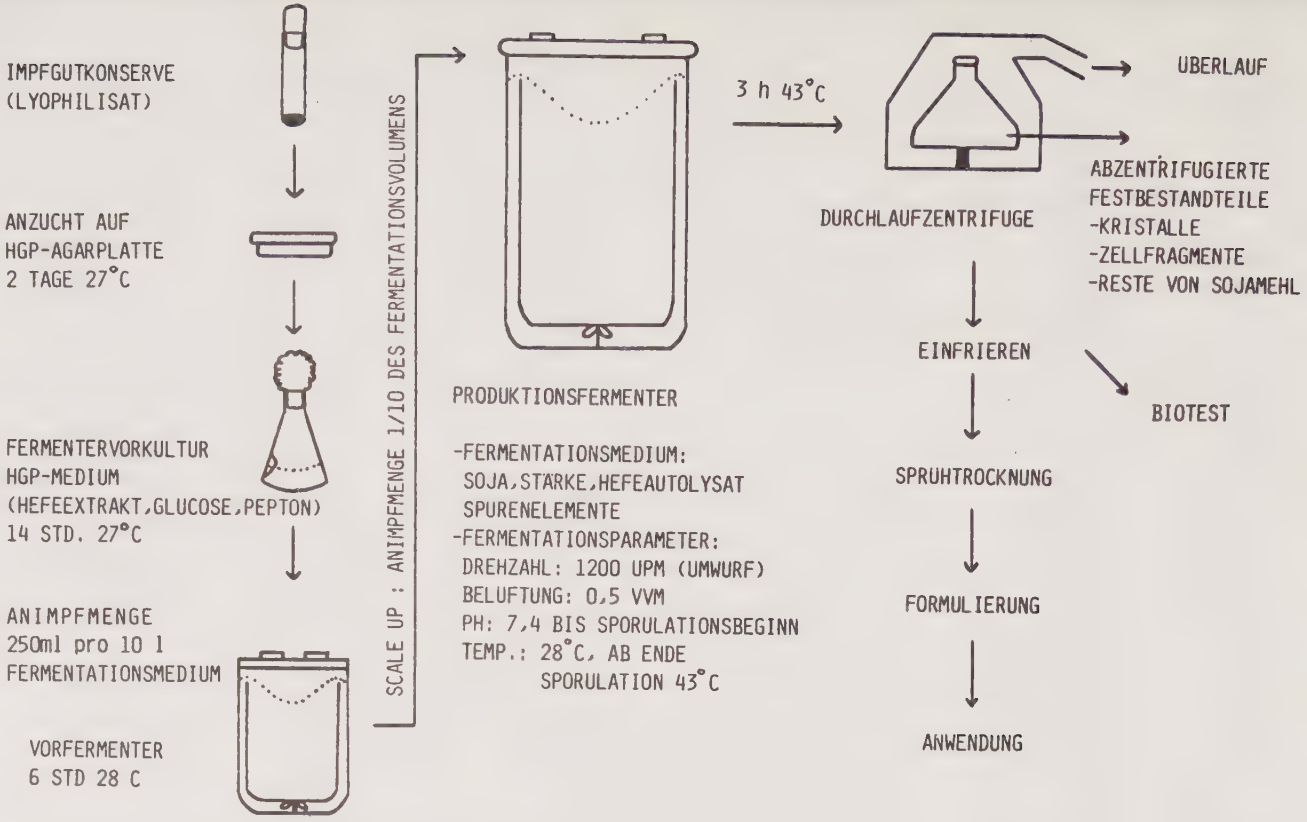


Abb.22: Produktion eines B.t.i-Kristallpräparats mit dem Stamm HA9

und können dann für den Biotest bzw. die weitere Formulierung des Präparats herangezogen werden und kommen schließlich als fertiges Präparat zur Anwendung.

Eigene Fermentationsernten aus 200-l-Fermentern wurden von der Firma BASF als Grundlage zur Formulierung und zur Applikation verwendet. Dort wurde das Fermentationsverfahren mittlerweile im scale-up bis zum Kubikmeter-Maßstab ausgeweitet.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Von Bacillus thuringiensis var. israelensis wurde eine sporendefekte Mutante isoliert, deren Sporenbildung in einem frühen Stadium blockiert ist. Diese Mutante HA5 ist aber noch in der Lage, einen vollständigen parasporalen Kristall zu bilden.

Die Sporenbildung von HA5 endet während Stadium III der Sporulation. Es werden im wesentlichen nur noch die beiden Präsporenmembranen gebildet. Die Präspore wird deshalb wie das Sporangium lysiert, so daß am Ende einer Fermentation nur Kristalle freigesetzt werden. Dies führt aufgrund der fehlenden Spore zu einem keimfreien und konzentrierten Kristallpräparat.

Bei Fermentationen in komplexen Medien sporulieren nicht alle Zellen einer Kultur, einige bleiben in vegetativem Zustand. Dies führt dazu, daß nach Lyse der Sporangien und den dabei freigesetzten Substraten, wieder Zellen erneut hochwachsen können. Die Folge ist eine anschließende Verdünnung der Kristalle im Kultursediment durch immer mehr vegetative Zellen. Durch Herstellung der temperatursensitiven Mutante HA9 konnte dieses Problem gelöst werden. Eine Temperaturerhöhung auf 43°C am Ende der Fermentation verhindert ein Wiederhochwachsen von vegetativen Zellen bzw. führt zur Lyse bereits vorhandener Zellen.

Für den Fermentationsprozess wurde ein preiswertes Medium aus 1% entfettetem Sojamehl, 0,5% Kartoffelstärke, 0,2% Hefeautolysat, 0,1% Dikaliumhydrogenphosphat und 0,1% Spurenelementelösung entwickelt, welches gute Ausbeuten ergab.

Damit Sporulation und damit Kristallbildung stattfinden kann, mußte für eine gute Sauerstoffversorgung im Fermenter gesorgt werden. Mit 1200 rpm und 0,5 vvm im Umwurffermenter und 300 rpm und 0,5 vvm im Blattrührfermenter war dies gewährleistet.

Zur Verkürzung und zeitlichen Stabilisierung des Fermentationsprozesses wurde der pH während der Wachstumsphase bei 7,4 konstant gehalten.

Ein scale-up bis auf 200-l konnte ohne Veränderung der Parameter und ohne Einbuße vorgenommen werden. Die Fermentation mit HA9 wird bei 28°C, 1200 rpm und 0,5 vvm durchgeführt. Nach etwa 20 Stunden wird die Temperatur auf 43°C erhöht und ungefähr nach weiteren vier Stunden kann die Fermentation beendet und geerntet werden.

Die Fermentation von HA9 führt zu einem keimfreien, hochkonzentrierten und sehr aktiven Kristallpräparat, das auch in der Bundesrepublik Deutschland gegen Stechmücken eingesetzt werden kann. Die Aktivität liegt nach bisherigen Tests fast zehnfach höher als bei einem Präparat , das mit dem Wildtyp hergestellt wird.

VI. L I T E R A T U R

Ames: Resolution of Bacterial Proteins by Polyacrylamid-Gel Electrophoresis on Stabs. J. Biol. Chem. 249, 634-644 (1974).

Angus: A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larval. Nature 173, 545 (1954).

Aronson,A.; Beckman,W. and Dunn,P.: Bacillus thuringiensis and Related Insect Pathogens. Microbiol. Rev. 50, 1-24 (1986).

Aronson,A. and Dunn,P.: Regulation of Protoxin Synthesis in Bacillus thuringiensis: Conditional Synthesis in a Variant is Suppressed by Cycloserine. FEMS Microbiol. Lett. 27, 237-241 (1985).

Arcas,J.; Yantorno,O.; Arraras,E. and Ertola,R.: A New Medium for Growth and Delta-Endotoxin Production by Bacillus thuringiensis var. kurstaki. Biotechnol. Lett. 8, 495-500 (1984).

ASM-News: Renewed Interest in Bacillus thuringiensis Down on the Farm. ASM-News 51/7, 326 (1985).

Auden,J.; Gruner,J.; Nuesch,J. and Knüsel,F.: Some Statistical Methods in Nutrient Medium Optimalisation. Pathol. Microbiol. 30, 858-866 (1967).

deBarjac et Bonnefoi: Essai de Classification Biochemique et Serologique de 24 Souches de Bacillus du Type Bacillus thuringiensis. Entomophaga 7, 5-31 (1962).

deBarjac et Bonnefoi: Mise au Point sur la Classification des Bacillus thuringiensis. Entomophaga 18, 5-17 (1973).

Baumann,L.; Ohamoto,K.; Unterman,B.; Lynch,M. and Baumann,P.: Phenotypic Characterization of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. J. Invert. Pathol. 44, 329-341 (1984).

Bechtel and Bulla: Electron Microscope Study of Sporulation and Parasporal Crystal Formation in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. 128, 1472-1481 (1976).

Bechtel and Bulla: Membrane Developement during Bacillus thuringiensis Sporulation; in Sporulation and Germination; American Society for Microbiology, 200-204 (1981).

Bernhard,K.; Mahnke,M.; Weisser,H. und Meyborg,S.: Size and Numbers of Subunits in Parasporal Crystals of Pathotyp B Strains of Bacillus thuringiensis (in Vorbereitung) (1986).

Bouguerra,M.: Les Pesticides et le Tiers Monde. La Recherche 176, 545- 553 (1986).

Charles,J. et deBarjac,H.: Sporulation et Cristallogenese de Bacillus thuringiensis var. israelensis en Microscopie Electronique. Ann.Microbiol. (Inst.Pasteur) 133A, 425-442 (1982).

Charles,J. et deBarjac,H.: Action des Cristaux de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur le Intestin Moyen des Larves de Aedes Aegypti L. en Microscope Electronique. Ann.Microbiol. (Inst.Pasteur) 134A, 197- 218 (1983).

Cheung,P. and Hammock,B.: Separation of Three Biologically Distinct Activities from the Parasporal Crystal of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Curr. Microbiol. 12, 121-126 (1985).

Demain,A.: New Applications of Microbial Products. Science, 219, 709-714 (1983).

Dulmage,H.: Production of the Spore-Delta-Endotoxin Complex by Variants of Bacillus thuringiensis in Two Fermentation Media. J. Invert. Pathol. 16, 385-389 (1970).

Dulmage,H.: Production of Delta-Endotoxin by 18 Isolates of B.t. Serotype 3, in 3 Fermentation Media. J. Invert. Pathol.18, 353-358 (1971).

Dworkin,M.: The Bacillus Endospore; in The Bacteria Vol.VII: Mechanisms of Adaptation; ed. Gunsalus; Academic Press: 3-28 (1979).

Ellar and Lundgren: Fine Structure of Sporulation in Bacillus cereus Grown in a Chemically Defined Medium. J. Bacteriol. 96, 1748-1764 (1966).

Fast: Bacillus thuringiensis: Its History and Mode of Action. Dev.Ind.Microbiol. 15, 195-198 (1974).

Fawcett,J. and Scott,J.: A Rapid Method for the Determination of Urea. J. Clin.Path. 13, 156-159 (1960).

Foda,M and Salama,H.: New Fermentation Technologies for the Production of Bacterial Insecticides.Zbl.Mikrobiol. 141, 151-157 (1986).

Foda,M.; Salama,H. and Selim,M.: Factors Affecting Growth Physiology of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 50-52 (1985).

Franz,J. und Krieg,A.: Biologische Schädlingsbekämpfung, 3. Auflage. Pareys Studientexte 12 (1982).

Goldberg,L. and Margalit,J.: A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidal Activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univivatus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosquito News 37, 355-358 (1977).

Gollakota,K. and Halverson,O.: Biochemical Changes Occuring in Bacillus cereus During Sporulation; in Spores II, ed. Orin Halvorson; Burgess Publ. Comp., 113-119 (1961).

Gonzalez,J. and Carlton,B.: A large Transmissible Plasmid is Required for Crystal Toxin Production in Bacillus thuringiensis var. israelensis. Plasmid 11, 28-38 (1984).

Hasenböhler,A.: Instrumentierung von Fermentationsanlagen. Dissertation Uni. Tübingen (1978).

Hecker.M.: Bakterien als Objekte für das Studium der molekularen Mechanismen der Zelldifferenzierung. Biol. Rundschau 18, 133-146 (1980).

Ibarra,J. and Federici,B.: Isolation of a Relatively Non-toxic 65-Kilodalton Protein Inclusion from the Parasporal Body of Bacillus thuringiensis subsp.israelensis. J. Bacteriol. 165, 527-533 (1986).

Ibarra,J. and Federici,B.: Parasporal Bodies of Bacillus thuringiensis subsp. morrisoni (PG-14) and Bacillus thuringiensis subsp. israelensis are Similar in Protein Composition and Toxicity. FEMS Microbiol. Lett. 34, 79-84 (1986).

Iglisch,I.: Zur Ökologie und über Methoden in der Stechmükkenbekämpfung. Anz. Schädlingskunde 53, 1-5 (1980).

Insell,J. and Fitz-James,P.: Composition and Toxicity of the Inclusion of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl.and Environ.Microbiol. 50, 56-62 (1985).

Krieg,A.: Die Wirkung ultravioletter Strahlen auf Sporen von Bacillus thuringiensis und Versuche zum Strahlenschutz. Zschr.Pf.krankheit 81, 591-596 (1974).

Krieg,A.: The Genus Bacillus: Insekt Pathogens; in The Procaryotes Vol.II, Setion S, 136: 1743 f. (1981).

Krieg,A.; Engler,S. und Rieger,M.: Produktion von Präparaten auf der Basis von Bacillus thuringiensis var. israelensis mit UV-aktivierten Sporen zur biologischen Bekämpfung von Mückenlarven. Anz. für Schädlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltschutz, 35Jg., Heft 9, 129-133 (1980).

Krieg,A.; Huger,A.; Langenbruch,G. und Schnetter,W.: Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. angewandte Ent. 96, 500-508 (1983).

Krieg,W.: persönl. Mitteilung

Kohiyama, Cousin, Ryter et Jacob: Mutants Thermosensibles de E.coli K 12; Isolement et Characterisation Rapide. Ann.Inst.Pasteur 110, 465f.

Laemmli: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970).

Lakhim-Tsror,L.; Pascar-Gluzman,C.; Margalit,J. and Barak,Z.: Larvicidal Activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, serovar.H-14 in Aedes aegypti: Histopathological Studies. J. Invert. Pathol. 41, 104-116 (1983).

Laurent,P. et Charles,J.: Action Comparee des Cristaux Solubilises des Serotypes H-14 et H-1 de Bacillus thuringiensis sur des Cultures de Cellules de Aedes aegypti. Ann.Microbiol. (Inst.Pasteur) 135A, 473-484 (1984).

Lee,S.; Eckblad,W. and Bulla,L.: Diversity of Protein Inclusion Bodies and Identification of Mosquitocidal Protein in Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 953-960 (1985).

Lüthy,P.: Insecticidal Toxins of Bacillus thuringiensis. FEMS Microbiol.Lett. 8, 1-7 (1980).

Lüthy,P.: Das delta-Endotoxin von Bacillus thuringiensis; Struktur und Wirkungsweise. Swiss Biotech.4,Nr.1a, 18-20 (1986).

Meyborg,S.: Tryptische Fingerprints von Bacillus thuringiensis. Diplomarbeit, Uni Tübingen. (1986)

Miller,L.; Lingg,J. and Bulla,L.: Bacterial, Viral and Fungal Insecticides. Science, 219,715-722 (1983).

Murrell and Warth: Composition and Heat Resistance of Bacterial Spores; in Spores III; American Society for Microbiol.:1-24 (1965).

Murrell, Ohye and Gordon: Cytological and Chemical Structure of the Spore; in Spores IV; American Society for Microbiol.: 1-18 (1969).

Nishiitsutsuji-Uwo,J. and Eda,M.: Sporeless Mutants of Bacillus thuringiensis. II. Mutants Derived from var. thuringiensis and var. sotto. Experientia 31, 1285-1287 (a.1975).

Nishiitsutsuji-Uwo,J.; Wakisaka,Y. and Eda,M.: Sporeless Mutants of Bacillus thuringiensis. J. Invert. Pathol. 25, 355-361 (b.1975)

Nishmura,M. and Nishiitsutsuji-Uwo,J.: Sporeless Mutants of Bacillus thuringiensis. III. The Process of Crystal Formation. Tissue and Cell 12(2), 233-242 (1980).

Oh,Y. and Freese,E.: Manganese Requirement of Phosphoglycerate-Phosphomutase and Its Consequences for Growth and Sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 127, 739-746 (1976).

Ohba,M. and Aizawa,K.: A New Subspecies of Bacillus thuringiensis Possessing 11a:11c Flagellar Antigenic Structure: Bacillus thuringiensis subsp. kyushuensis. J. Invert. Pathol. 35, 387-388 (1979).

Ohye and Murrell: Exosporium and Spore-coat Formation in Bacillus cereus T. J. Bacteriol. 115, 1179-1190 (1973).

Padua,L.; Ohba,M. and Aizawa: The Isolates of Bacillus thuringiensis Serotype 10 with a Highley Preferencial Toxicity to Mosquito Larvae. J. Invert. Pathol. 36, 180-186 (1980).

Percy,J. and Fast,P.: Bacillus thuringiensis Crystal Toxin: Ultrastructural Studies of Its Effect on Silkworm Midgut Cells. J. Invert. Pathol. 41: 86-98 (1983).

Ribier,J. et Lecadet,M.: Etude Ultrastructurale et Cinetique de la Sporulation de B.t. var. Berliner 1715. Remarques sur la Formation de la Inclusion Parasporal. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 124B, 341-344 (1973).

Riedel,K.: Nährstofflimitation und Differenzierung bei Bacillus. Biol. Rundschau 23, 1-9 (1985).

Rutschke.J.: persönliche Mitteilung

Salama,H.; Foda,M.; Selim,M. and El-Sharaby,A.: Utilization of Fodder Yeast and Agro-Industrial By-Products in Production of Spores and Biologically-Active Endotoxins from Bacillus thuringiensis. Zbl. Mikrobiol. 138, 553-563 (1983).

Sekar,V. and Carlton,B.: Molecular Cloning of the Delta-Endotoxin Gene of Bacillus thuringiensis var.israelensis. Gene 33,151-158 (1985).

Singer,S.: Potential of Bacillus sphaericus and Related Spore-forming Bacteria for Pest Control; in H.D. Burges (ed.), Microbial Control of Pests and Plant Diseases; Academic Press: 283-298 (1981).

Thomas,W. and Ellar,D.: Bacillus thuringiensis var. israelensis Crystal Delta-Endotoxin Effects on Insect and Mammalain Cells in Vitro and in Vivo. J. Cell Sci.60, 181-197 (a.1983).

Thomas,W. and Ellar,D.: Mechanism of Action of Bacillus thuringiensis var. israelensis Delta-Endotoxin. FEBS Lett. 154, 362-368 (b.1983)

Tipper and Gauthier: Structure of the Bacterial Endospore; in Spores V; American Society of Microbiol.: 3-11 (1972).

Tyrell,D.; Bulla,L.; Andrews,R.; Kramer,K.; Davidson,L. and Nordin,P.: Comparative Biochemistry of Entomocidal Parasporal Crystals of Selected Bacillus thuringiensis Strains. J. Bacteriol. 145, 1052-1062 (1981).

Tyrell,D.; Davidson,L.; Bulla,L. and Ramoska,W.: Toxicity of Parasporal Crystals of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis to Mosquitos. Appl. and Environ. Microbiol. 38, 656-658 (1979).

Visser,B.; van Workum,M.; Dullemans,A. and Waalwijk,C.: The Mosquitocidal Activity of Bacillus thuringiensis var. israelensis is Associated with M_r 230 000 and 130 000 Crystal Proteins. FEMS Microbiol. Lett. 30,211-214 (1986).

Wakisaka,Y.; Masaki,E. and Nishimoto,Y.: Formation of Crystalline Delta-Endotoxin or Poly-beta-hydroxybutyric-Acid Granules by Asporogenous Mutants of Bacillus thuringiensis. Appl.and Environ. Microbiol., 43, 1473-1480 (1982).

Weisser,H.: Herstellung und Charakterisierung einer asporogenen Mutante von Bacillus thuringiensis var. israelensis. Diplomarbeit, Uni Tübingen,(1983).

Yamamoto,T.; Iizuha,T. and Aronson,J.: Mosquitocidal Protein of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis: Identification and Partial Isolation of the Protein. Curr. Microbiol. 9, 279-284 (1983).

Yousten,A.: Isolation and Characterisation of Oligosporogenic, Paraspore-forming Mutants of Bacillus thuringiensis serovar israelensis. FEMS Microbiol. Lett. 33, 59-63 (1986).

Lebenslauf

HARALD WEISSER

27.03.1954	geboren in Rottweil
1961 - 1965	Eichendorff-Volksschule Rottweil
1965 - 1974	Leibniz-Gymnasium Rottweil
1974	Abitur
1974 - 1976	Studium der Geographie und Physik, Universität Karlsruhe
1976 - 1977	Tätigkeit in einer orthopädischen Werkstatt
1977 - 1983	Studium der Biologie, Universität Tübingen
1982	Diplomhauptprüfung
1982 - 1983	Diplomarbeit am Lehrstuhl Mikrobiologie I der Universität Tübingen, unter Anleitung von Herrn Prof.Dr. H. Zähner und Herrn Dr.K.Bernhard.
1983 - 1986	Doktorarbeit in derselben Arbeitsgruppe unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.H. Zähner und Herrn Dr.Bernhard.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, R. Apfelbach, C.F. Bardele, E. Bayer, W. Bessler, E. Betz, V. Braun, W. Engels, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.H. Hadeler, M. Hanack, V. Hemleben, R. Jacob, C. Jönsson, E. Kulzer, W. Löffler, D. Mecke, F.P. Möhres, H. Netzel, F. Oberwinkler, W. Pfeiffer, K. Poralla, H. Probst, E. Sander, B. Schwemmle, H.U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, A. Wendel, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Wolf, H. Zähner.

Offsetdruck Spangler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45